



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**Actualidad y perspectivas futuras en el diagnóstico y
tratamiento farmacológico de las enfermedades raras:
Impacto de las nuevas tecnologías de secuenciación del
DNA `Next Generation Sequencing`**

Autor: Alba Rodríguez Rius

D.N.I.: 05337984-Y

Tutor: María Jesús Miró Obradors

Convocatoria: Junio 2015

ÍNDICE

RESUMEN	2
I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	2
II. OBJETIVOS.....	3
III. METODOLOGÍA	4
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	5
1. SITUACIÓN ACTUAL: DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO	5
<i>Diagnóstico.....</i>	5
<i>Medicamentos huérfanos</i>	6
<i>Tratamiento farmacológico.....</i>	7
<i>Problemática en el desarrollo de nuevas terapias.....</i>	8
2. PERSPECTIVAS FUTURAS: IMPACTO DE LAS NUEVAS TÉCNICAS DE SECUENCIACIÓN	9
<i>Nuevas técnicas de secuenciación NGS.....</i>	9
<i>Aplicaciones de las técnicas NGS en enfermedades raras.....</i>	11
<i>Limitaciones en la aplicación a la práctica clínica</i>	12
<i>Proyectos en marcha.....</i>	13
3. PERSPECTIVAS FUTURAS: DESAFÍOS Y HERRAMIENTAS BÁSICAS EN DESARROLLO.....	14
<i>Registros de pacientes.....</i>	15
<i>Bancos de muestras biológicas</i>	15
<i>Modelos biológicos</i>	15
<i>Biomarcadores.....</i>	16
<i>Diseño de los ensayos clínicos.....</i>	16
V. CONCLUSIONES.....	17
BIBLIOGRAFÍA	18

Resumen

Las enfermedades raras suponen un conjunto de 5000-8000 enfermedades poco comunes que en total afectan a 29 y 30 millones de personas en Europa y Estados Unidos respectivamente. La mayoría son crónicas, progresivas, degenerativas, con altas tasas de letalidad y, por su marcado carácter genético, pueden beneficiarse de los avances en secuenciación génica. En este estudio se analiza la situación actual y las perspectivas futuras de estas enfermedades en cuanto a diagnóstico y tratamiento farmacológico, prestando especial atención al impacto las técnicas de secuenciación NGS (*Next Generation Sequencing*). Se ha llevado a cabo a partir de la revisión, documentación e investigación bibliográfica, el análisis de los resultados obtenidos y su discusión. El ámbito del estudio abarca el contexto mundial, profundizando en el marco Europeo y en la situación particular de España. La situación actual queda caracterizada por la demora diagnóstica y la escasez de tratamientos disponibles. Se describen las características y aplicaciones de las técnicas NGS y su relación con un aumento exponencial en el número de causas genéticas identificadas y de test diagnósticos disponibles. El desarrollo de nuevas terapias no avanza al mismo tiempo, pero existen medidas puestas en marcha para cambiar esta situación (modelos biológicos, optimización de los diseños de ensayos clínicos, etc.). Como conclusión del estudio, se puede afirmar que las NGS han tenido un gran impacto en el avance científico sobre el conocimiento de estas enfermedades, si bien será necesaria la colaboración internacional y el apoyo institucional para que dicho impacto se traslade, de manera más efectiva, a la práctica clínica.

I. Introducción y Antecedentes

El concepto de “enfermedades raras” surge como forma de agrupar las enfermedades poco comunes, entendiendo que requieren de un abordaje tanto político como científico distinto al que necesitan aquellas patologías más frecuentes. El termino *rare disorder* se introduce en la legislación por primera vez en Estados Unidos, en el *Orphan Drug Act of 1984*, a raíz de las peticiones de un tratamiento gubernamental específico para estas patologías por parte de la asociación de pacientes *National Organization of Rare Disorders* (NORD) [1]. En Europa, el concepto se define por primera vez en 1999, introduciéndose en la legislación la definición epidemiológica de las mismas y estableciendo las acciones básicas a

desarrollar [2]. En 2007, la Comisión Europea señala las enfermedades raras como una prioridad de los programas de Salud Pública, y supone el impulso necesario para que empiecen a desarrollarse planes estratégicos de acción a nivel nacional [3].

Según las definiciones adoptadas, las enfermedades raras son aquellas que afectan a menos de 5 personas por cada 10.000 habitantes en Europa, o a menos de 200.000 personas en Estados Unidos (aproximadamente, 7,5:10.000). Suponen un conjunto de entre 5.000 y 8.000 enfermedades que afectan a diversos sistemas, cuya prevalencia en conjunto se estima en 29 millones de personas en la Unión Europea. El 80% de estas enfermedades son genéticas, mientras que el 20% restante se debe a causas infecciosas o ambientales. La mayoría son patologías crónicas, progresivas y degenerativas con gran impacto sobre la calidad de vida de los pacientes, causantes de discapacidad y con altas tasas de letalidad [4].

La baja prevalencia de cada enfermedad supone una dificultad importante para su investigación, tanto a nivel de financiación como en el acceso a pacientes y/o a sus muestras biológicas para la investigación básica sobre sus causas o desarrollo natural. El poco conocimiento científico de muchas de estas enfermedades supone una gran limitación en el diagnóstico de las mismas, que además es especialmente difícil cuando no existen centros de referencia ni protocolos que lo guíen [5]. A su vez, estas enfermedades comparten una gran problemática en cuanto al tratamiento farmacológico, cuya investigación y comercialización no es rentable y depende en muchos casos de financiación particular, de asociaciones de pacientes, o de políticas específicas de estímulo [4].

Dado el marcado carácter genético de estas enfermedades, tanto la investigación como el diagnóstico y el tratamiento de las mismas puede beneficiarse de los avances científicos en el área de la secuenciación génica. En este contexto, las nuevas técnicas de secuenciación (Next Generation Sequencing), suponen un salto cualitativo en tiempo, coste y aplicaciones respecto a la secuenciación clásica. El empleo de estas técnicas en la investigación de enfermedades raras es ya un hecho y supone un tema de interés creciente, que está abriendo nuevas puertas en la práctica clínica [6].

II. Objetivos

1. Analizar la situación actual de las enfermedades raras en cuanto a diagnóstico y tratamiento farmacológico, en el contexto mundial, profundizando en el marco Europeo y en la situación concreta de España.

2. Analizar las perspectivas futuras del diagnóstico y tratamiento:
 - 2.1 Describir el impacto que pueden tener las nuevas técnicas de secuenciación,
 - 2.2 Describir los retos y expectativas que se plantean, así como otras herramientas y medidas en desarrollo.

III. Metodología

1. Revisión, documentación e investigación bibliográfica.
 - 1.1. Búsqueda y selección de las fuentes principales de información en bibliotecas y servidores online.
 - 1.2. Investigación bibliográfica en las fuentes de información seleccionadas:
 - 1.2.1. Sitios web de entidades y asociaciones dedicadas a las enfermedades raras: EURORDIS (Rare Diseases Europe – www.eurordis.org), IRDiRC (International Rare Diseases Research Consortium – www.irdirc.org), Orphanet (Portal for rare diseases and orphan drugs – www.orpha.net), CIBERER (Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras) y FEDER (Federación Española de Enfermedades Raras – www.enfermedades-raras.org).
 - 1.2.2. Sitios web de entidades relacionadas con la genética y las NGS: EuroGenTest (www.eurogentest.org) y NCBI (National Center for Biotechnology Information - www.ncbi.nlm.nih.gov)
 - 1.2.3. Bases de datos bibliográficas accesibles online: PubMed (del NCBI) y ScienceDirect.
 - 1.2.4. Sitios web institucionales: FDA (Food and Drug Administration - www.fda.com) y EMA (European Medicines Agency - www.ema.europa.eu)
2. Selección y estudio de las páginas web, informes y artículos más acordes a los objetivos del estudio partir de las fuentes de información investigadas.
3. Análisis de los resultados obtenidos, discusión de los mismos y obtención de conclusiones en base a los objetivos.
4. Redacción del trabajo. Se plantea siguiendo una estructura que permite cumplir con claridad los objetivos marcados, así como la normativa establecida para el Trabajo de Fin de Grado por la Facultad de Farmacia.
5. Bibliografía. Se recoge al final del trabajo, siguiendo el orden cronológico de aparición en el texto, dónde se cita la referencia numérica.

IV. Resultados y Discusión

1. Situación actual: diagnóstico y tratamiento

Diagnóstico

En función de las características de la enfermedad y del conocimiento científico que se tenga de la misma, el diagnóstico de una enfermedad rara puede realizarse mediante análisis de metabolitos (por espectrometría o cromatografía), análisis de función y/o expresión de proteínas, estudios genéticos o a través de pruebas funcionales [7].

El diagnóstico de una enfermedad rara es un proceso complejo debido, principalmente, a la falta de información científica tanto sobre el diagnóstico como sobre la clínica y a la inexistencia de protocolos y/o centros de referencia para el diagnóstico [8]. El tiempo medio de diagnóstico desde la aparición de los síntomas en Reino Unido es de 5,5 años, mientras que en Estados Unidos (EEUU) se estima en 7,6 años [9] y en España en 5 años [8]. Sin embargo, para valorar los tiempos medios de diagnóstico debe tenerse en cuenta que:

- (i) Hay enfermedades que, pese a ser raras, tienen un síntoma característico fácilmente reconocible mientras que otras son más inespecíficas y difíciles de diagnosticar en base a la clínica.
- (ii) El tiempo de diagnóstico es mucho menor si éste se realiza en el marco de un diagnóstico precoz que si se realiza una vez manifestada la enfermedad [4].
- (iii) Dentro de las enfermedades raras hay grandes diferencias de prevalencia y de información clínica disponible. Por ello, es difícilmente comparable, por ejemplo, el proceso diagnóstico de paquioniquia congénita, con más de 1000 casos descritos, con el de Síndrome de Sillence, con apenas 5 casos descritos [10].

Estos tres conceptos llevan a una gran dispersión en los tiempos de diagnóstico, que supone que el 38% de los pacientes tarden menos de un año en tener un diagnóstico correcto en España, mientras que un 20% tarda más de 10 años [8]. En este tiempo, los pacientes consultan de media a 8 especialistas distintos y reciben una media de 3 diagnósticos erróneos hasta conseguir el diagnóstico certero [9]. A su vez, en España, casi el 50% de los pacientes refiere haber tenido que desplazarse a otra provincia, mientras que cerca del 8% ha tenido que desplazarse a otro país [8].

Esta demora diagnóstica, tiene graves consecuencias sobre la salud del paciente. Por una parte, durante todo el tiempo que dure el diagnóstico, el paciente ya está manifestando

una enfermedad para la que no está siendo tratado, lo que resulta en secuelas tanto físicas (por el avance de la enfermedad y/o por complicaciones de la misma) como psicológicas. Por otra parte, el paciente puede tener descendencia sin saber que tiene una enfermedad genética ni los riesgos que ello puede conllevar para los hijos. Esto lleva, además, a que los pacientes consideren especialmente importante las consecuencias de la demora diagnóstica en el ámbito social, destacando el comportamiento inapropiado de familiares (por ejemplo, que no reconocen que el paciente sufre una enfermedad) y la desconfianza que les ha generado el sistema sanitario [4].

En esta situación, cabe destacar el papel esencial que juegan las asociaciones de pacientes y otras entidades sociales, que ofrecen en sus sitios web formas de contacto y programas especializados para ayudar a aquellos pacientes que aun no tienen un diagnóstico. A modo de ejemplo, FEDER (Federación Española de Enfermedades Raras) tiene un Servicio de Información y Orientación gratuito que tiene, como uno de sus objetivos principales, ayudar y orientar a dichos pacientes en la búsqueda de centros de referencia y recursos específicos. Por su parte, GlobalGenes, una organización sin ánimo de lucro fundada a partir de asociaciones de pacientes internacionales, tiene en marcha el proyecto “Undiagnosis Patients Program”, cuyo objetivo es poner a disposición de los pacientes que no tienen un diagnóstico confirmado las técnicas genéticas de diagnóstico a las que no han tenido acceso a través del sistema sanitario de su país de origen.

Medicamentos huérfanos

En Europa, los “medicamentos huérfanos” se definen en el reglamento CE/141/2000 [11] como “aquellos destinados a diagnosticar, prevenir o tratar una afección que ponga en peligro la vida o conlleve una incapacidad crónica y que no afecte a más de 5 personas por cada 10.000 de la Comunidad, o que, sin cumplir este criterio epidemiológico, resulte improbable que su comercialización, sin incentivos, genere suficientes beneficios como para justificar la inversión necesaria”. Esta definición es similar a la adoptada previamente en EEUU, en 1983, o en Japón en 1993. Al tiempo que se introduce esta definición, los citados reglamentos establecen la creación de comisiones encargadas de la autorización y registro de estos medicamentos, así como del desarrollo de políticas de estímulo para incentivar su investigación y comercialización. Dichos incentivos incluyen la exclusividad comercial (10 años en Europa y Japón, 7 en EEUU), la exención total o parcial de tasas en todo el proceso

de desarrollo y comercialización, así como subvenciones públicas para la investigación, y un sistema acelerado de comercialización [12].

Tanto la FDA como la EMA disponen de un registro actualizado de medicamentos huérfanos a disposición del público, desarrollados desde los años 1983 y 2000 respectivamente. En Enero de 2015, el listado Europeo [13] reúne 1153 medicamentos huérfanos, frente a los 3297 de la FDA [14]. Para la comparación de datos entre Europa y EEUU hay que considerar que el criterio epidemiológico que se usa en Europa para la designación de medicamento huérfano es más restrictivo. Los datos de nuevos medicamentos registrados cada año se recogen en la **Figura 1**, donde se puede observar la tendencia al aumento en el número de nuevos medicamentos huérfanos registrados. Solo en la primera quincena de enero de 2015, se han registrado 22 nuevos en Europa y 24 en EEUU, por lo que cabe suponer que la tendencia creciente se va a mantener.

Estos registros permiten, a su vez, acotar la búsqueda a aquellos fármacos que estén ya comercializados. En Mayo de 2015, tienen autorización de comercialización 91 medicamentos huérfanos en Europa y 156 en Estados Unidos.

Tratamiento farmacológico

De manera muy general podemos englobar los medicamentos utilizados para el tratamiento de enfermedades raras en cuatro grupos según su situación administrativa [15]:

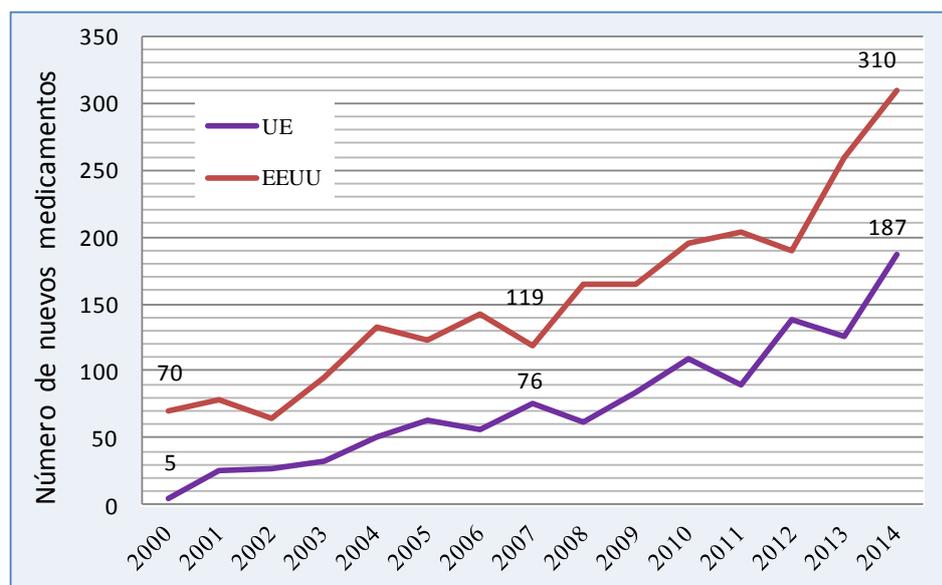


Figura 1 – Evolución del número de medicamentos huérfanos registrados cada año. Datos obtenidos de los registros de EMA y FDA.

- (i.) Medicamentos aprobados para la indicación en cuestión, comercializados en el país de origen, que pueden ser medicamentos huérfanos o sin esta designación (101 medicamentos no huérfanos indicados para una enfermedad rara en Europa en Abril de 2015 [16]).
- (ii.) Medicamentos aprobados para la indicación en cuestión pero no comercializados en el país de origen, que deben obtenerse según la política de medicamentos extranjeros.
- (iii.) Medicamentos en fase de investigación, a los que pueden acceder a través de inclusión en ensayos clínicos o por el procedimiento de uso compasivo.
- (iv.) Medicamentos no aprobados para la indicación en cuestión. La prescripción para un uso no aprobado es responsabilidad del médico que lo prescribe, y puede ser reevaluada por la Gestión del hospital o autoridad sanitaria competente,

El estado a nivel administrativo del tratamiento afecta tanto a la facilidad de acceso al mismo como al coste económico que tenga para el paciente. En España, el 17,43% de los pacientes dice tener dificultades para acceder a los productos farmacéuticos y sanitarios que necesita, y un 9,48% dice no poder acceder a los mismos. Respecto al coste, solo el 27,21% declara que la Seguridad Social cubre todos los productos que necesita, y un 4,99% dice que no cubre ninguno de los productos que necesita [8].

Problemática en el desarrollo de nuevas terapias

En base a los datos aportados anteriormente, apenas el 3% de las enfermedades raras tienen algún medicamento disponible. Este dato encuentra justificación en las limitaciones a las que se enfrenta el desarrollo de nuevas terapias en tres ámbitos distintos:

- (i) Limitaciones técnico-científicas, como son la falta de información sobre la causa genética, las implicaciones bioquímicas o la historia natural de las enfermedades, entre otras. Identificar dianas terapéuticas o abrir nuevas vías de investigación aplicada es difícil de llevar a la práctica cuando aun no existe un nivel de desarrollo suficiente en la investigación básica [17].
- (ii) Falta de financiación, siendo esta la principal limitación que encuentran los grupos y/o entidades que plantean una investigación al respecto de estas enfermedades [18].
- (iii) Dificultad en el planteamiento de un ensayo clínico. La comparación entre ensayos clínicos sobre enfermedades raras y otras enfermedades arroja diferencias significativas como son el menor número de participantes, la menor aleatorización, menor enmascaramiento y mayor tiempo de duración. Con estos factores, en muchos

casos, pese a que una terapia arroje resultados positivos, es difícil demostrar el nivel de evidencia suficiente como para justificar una autorización comercial [19].

2. Perspectivas futuras: Impacto de las nuevas técnicas de secuenciación

Nuevas técnicas de secuenciación NGS

El método de terminación de cadena de Sanger surge en 1977 y se establece como método de referencia de secuenciación del DNA. En sus inicios, la secuenciación se hacía de forma manual y abarcaba lecturas de apenas 80 pares de bases (pb). A medida que la secuenciación del DNA, y especialmente del genoma humano, se convierte en un tema de interés central de la ciencia a nivel mundial, la técnica se va optimizando, hasta desarrollarse los secuenciadores automáticos que permitían analizar a la vez 96 muestras de ADN con una longitud de lectura de entre 500-1000 pb [20]. Sin embargo, el coste de la secuenciación era inasumible, lo que impulsó el desarrollo de nuevas técnicas de secuenciación (Next Generation Sequencing), que podemos englobar en dos grupos: las de segunda generación, de secuenciación masiva en paralelo, y los de tercera generación [21].

Las principales plataformas de secuenciación de segunda generación comparten las líneas generales del proceso. En primer lugar, se fragmenta el DNA y se unen dichos fragmentos a secuencias adaptadoras *in vitro*. A continuación, los fragmentos se aíslan y se amplifican por PCR. Por último, se secuencian los fragmentos mediante ciclos enzimáticos, obteniendo la información sobre las bases incluidas en cada ciclo de secuenciación mediante imagen [20, 20]. Las tres principales plataformas (454 de Roche, Solexa de Illumina y SOLiD de Applied Biosystems) difieren en la metodología de aislamiento y copia, la enzima utilizada y la técnica de generación de imágenes. Las características específicas de cada plataforma, así como sus especificaciones técnicas principales se recogen en la **Tabla 1**.

Estas nuevas técnicas han cambiado totalmente la situación de la secuenciación genética tanto en la investigación básica como en la aplicada a la clínica, aumentando de forma notable tanto la magnitud como la velocidad de las lecturas, lo que en la práctica supone poder obtener mucha más información, de forma mucho más rápida, con una cantidad de DNA que era impensable con el método de Sanger. Sin embargo, la principal característica de estas técnicas es su bajo coste [25]. Según el *National Human Genome Research Institute*, el coste de secuenciación del genoma humano (estimado en 3000MB y teniendo en cuenta también los costes indirectos) se ha reducido de los más de 95 millones de dólares en 2001, a 4.905 dólares en Julio de 2014, manteniéndose constante la reducción durante los últimos 5

años, a medida que se optimizan los secuenciadores y toda la metodología asociada a la secuenciación.

La principal limitación de estas plataformas es la correcta interpretación de los datos que permiten obtener. La variabilidad inherente al genoma humano hace que la aplicación de estos métodos de secuenciación a la investigación o diagnóstico de enfermedades dependan totalmente del desarrollo paralelo de plataformas de bioinformática (como OMIM del NCBI) y software (como MAQ) capaces de analizar la información, filtrando aquellas variantes que son “normales”. Para ello, es necesario establecer un criterio de “normalidad”, para lo que los recursos más habituales son la comparación del DNA de estudio con otro DNA de referencia, ya sea en busca de coincidencias o de diferencias, y aplicándolo a sujetos individuales o a grupos de sujetos que comparten la presencia o ausencia de una enfermedad. Una vez obtenidas las secuencias a comparar, las plataformas de bioinformática permiten filtrar las variantes identificadas, descartando, por ejemplo, aquellas que tengan alta tasa de variabilidad o las que se hayan leído más de una vez. Una vez reducido el número de variantes “de riesgo”, debe aplicarse un criterio de plausibilidad biológica que permita, finalmente, identificar la variante causal [26].

	454/Roche	Solexa/Illumina	SOLiD /AB
Aislamiento y copia	PCR emulsión	PCR en puente	PCR emulsión
Enzima	Polimerasa	Polimerasa	Ligasa
Generación imagen	Sulfurilasa y luciferasa	Desoxi-NTs fluorescentes	NTs fluorescentes en octámeros
Secuenciador	GS FLX+	Hi Seq 4000	SOLiD 4
Longitud de lectura	>1000 pb	50 pb	50 pb
Tiempo de carrera	23 días	1-3.5 días	6-8 días
Lecturas por carrera	>1 millón	2.1-2.5 billones	>700 millones
Secuencia	700 Mb	215-250 Gb	40-50 Gb

Tabla 1 – Especificaciones y características de las principales plataformas NGS. Datos obtenidos de las fichas de los secuenciadores de Roche, Illumina y Applied Biosystems [22, 23 y 24].

Aplicaciones de las técnicas NGS en enfermedades raras.

Las enfermedades raras son, junto al cáncer, el grupo de patologías que más se están beneficiando de estas nuevas técnicas. Los métodos de aplicación abarcan dos técnicas principales [27]:

- (i) Secuenciación del exoma. El exoma es la parte codificante del DNA y supone aproximadamente el 1,5% del genoma humano. Esta técnica consiste en secuenciar el exoma completo o una región del mismo con el fin de identificar una mutación genética como causantes de una patología. Es por tanto la principal aplicación en investigación básica, fundamental para el desarrollo tanto de test diagnósticos como de nuevos tratamientos.
- (ii) Paneles para la detección de una mutación por re-secuenciación dirigida. Esta técnica es la principal aplicación en la práctica clínica, permitiendo el diagnóstico genético de una determinada patología cuya causa genética ya está establecida. Supone la secuenciación de uno o varios genes o regiones para la búsqueda de una o varias mutaciones, ya descritas previamente como causantes de dicha patología. Puede aplicarse a varias patologías a la vez, diseñándose paneles que buscan distintas mutaciones.

La investigación básica es, por tanto, uno de los campos de aplicación más importantes. En este sentido, en los últimos 5 años, cuando las NGS se han convertido en técnicas de referencia, el número de enfermedades raras para las que se ha encontrado una variante causal ha ido ascendiendo exponencialmente. Actualmente, aproximadamente 3500 de estas enfermedades se han relacionado directamente con un gen [6]. Cuando se conoce la función del gen en cuestión, establecer dicha relación permite profundizar en el mecanismo molecular de la patología, en su historia natural y, sobre todo, abre una vía importante a la búsqueda de terapia, que en muchos casos puede tratarse simplemente de compensar el desequilibrio bioquímico generado por la variante genética (administrar una enzima deficitaria, inhibir vías metabólicas sobreestimuladas, etc.)

Sin embargo, la aplicación más directa de la identificación de la variante genética causal es, sin duda, el desarrollo de test diagnósticos mediante la búsqueda de esa variante. Este hecho, sumado a que las NGS permiten acercar las técnicas diagnósticas a la práctica clínica habitual (dadas sus características de precio, tiempo, etc.) está suponiendo, actualmente, el incremento constante, cada vez a una velocidad mayor, del número de test genéticos disponibles para enfermedades raras [6]. En la **Figura 2** se recoge la evolución en el

número de test diagnósticos disponibles y en el número de causas genéticas descubiertas durante los últimos 5 años.

Por otra parte, el diseño de paneles que permiten el diagnóstico de varias patologías distintas es especialmente interesante en estas enfermedades, en las que los síntomas no están siempre bien descritos. Así, por ejemplo, el laboratorio *GeneDx* ofrece un panel de diagnóstico de desórdenes neuromusculares que mediante la re-secuenciación de 76 genes distintos permite buscar el diagnóstico de 12 enfermedades neuromusculares raras diferentes.

Limitaciones en la aplicación a la práctica clínica

Pese a la cantidad de test diagnósticos ya desarrollados, el acceso de los pacientes a estos test en la práctica clínica habitual está limitado. La problemática asociada puede enmarcarse en dos grandes áreas: marco legislativo y consideraciones éticas.

En cuanto a la legislación, no hay un criterio de validación y regulación común para estas técnicas. *EuroGenTest* es un proyecto de la Comisión Europea que nace con la intención de armonizar y regular los test genéticos en Europa, mediante la creación de registros de laboratorios y test, así como el desarrollo de guías de buenas prácticas. En Diciembre de 2014 publican el borrador final de “Guidelines for diagnosis next generation sequencing” [27], si bien no son normas de obligado cumplimiento y cada país se rige por una legislación propia, en la mayoría de los casos poco concreta y aún no adaptada al impacto de las NGS. En Estados Unidos, la situación es similar, siendo el informe del *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG), “ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing” [28], las recomendaciones de referencia para la aplicación de estas técnicas, si bien tampoco son de obligado cumplimiento.

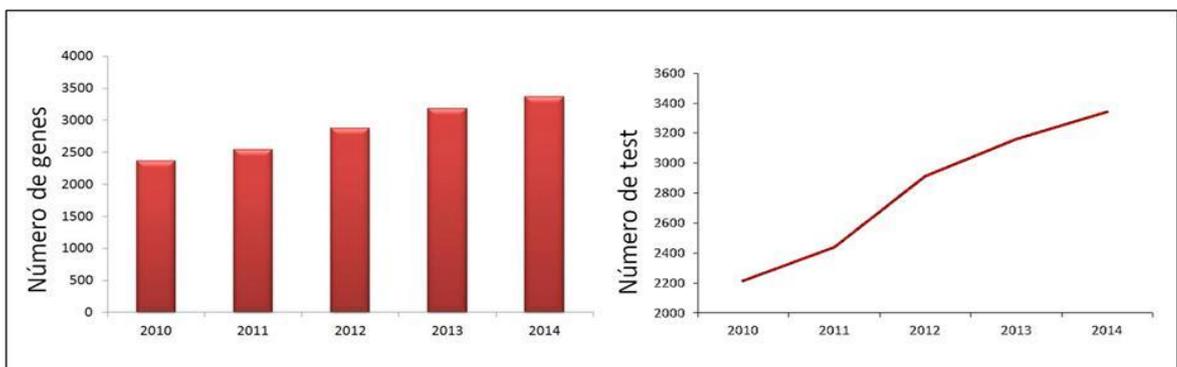


Figura 2 – Evolución en el número de genes relacionados con una enfermedad rara y en el número de test diagnósticos disponibles. Fuente de las imágenes: IRDiRC

Respecto a las consideraciones éticas, es necesario valorar que los test genéticos pueden aportar mucha más información de la que se esperaba encontrar (por ejemplo, mutaciones que se hayan relacionado con un aumento considerable del riesgo de un determinado cáncer), lo que supone un dilema ético y profesional, entre el derecho a la intimidad en base a la información que se recogía en el consentimiento informado previo al test y el derecho del sujeto a conocer información clínica que pueda tener trascendencia en su vida [29]. Por otra parte, los laboratorios ofrecen estos test directamente a los pacientes, lo que en ocasiones puede suponer que no intervenga un profesional de la salud en el proceso, lo que conlleva riesgos en la interpretación de la información. Es necesario, por tanto, que la regulación específica de la aplicación de estas técnicas aborde también estas cuestiones.

Proyectos en marcha

Actualmente EURORDIS está colaborando en el proyecto “Genetic Clinic Of the Future” (CGOF), cuyo objetivo es recoger la opinión de pacientes y profesionales acerca de la mejor manera de implementar estas técnicas NGS en la práctica clínica, para publicar un Libro Blanco al respecto, en base a las necesidades y expectativas que se discutan durante el desarrollo del proyecto.

Paralelamente, se están llevando a cabo proyectos de secuenciación masiva cuyos objetivos no se limitan al descubrimiento de causas genéticas sino que se centran también en la aplicación de estos conocimientos a la práctica clínica.

Uno de ellos se está llevando a cabo en Reino Unido, desde Octubre de 2013. Es el proyecto “UK10K”, coordinado por la Universidad de Cambridge, con la colaboración de Illumina y Genomics England. En este proyecto, se está secuenciando el DNA de 10.000 personas que sufren enfermedades raras, con el objetivo, no solo de identificar causas genéticas, sino de desarrollar y optimizar la aplicación de la secuenciación al diagnóstico en la práctica clínica habitual.

A su vez, en España, la Junta de Andalucía, con la colaboración de *Roche*, está llevando a cabo el Proyecto Genoma Médico (PGM). En este proyecto están secuenciando el genoma de personas afectadas por diversas enfermedades raras mediante 11 equipos de secuenciación de alto rendimiento (7 GS-LX de *Roche* y 4 Solid™ 4 de *Applied Biosystems*), con el objetivo final de identificar 50 nuevos genes relacionados con estas

patologías. Además pretende, entre otros, desarrollar nuevas herramientas de bioinformática y establecer nuevas Terapias Avanzadas.

3. Perspectivas futuras: desafíos y herramientas básicas en desarrollo

El *International Rare Diseases Research Consortium* (IRDiRC), en su documento “Police and guideliness” [30], de 2013, plantea una serie de objetivos a alcanzar en los próximos años. En el ámbito del diagnóstico, establece la meta de que 6000 enfermedades raras tengan un diagnóstico clínico accesible en 2020. En cuanto al tratamiento, presenta como objetivo que en el periodo 2010-2020 se hayan desarrollado 200 nuevas terapias.

Las técnicas NGS serán fundamentales para cumplir estos objetivos, tanto como herramientas diagnósticas como en el ámbito de la investigación básica. Sin embargo, la relación directa entre la identificación de causas genéticas y el desarrollo de test diagnóstico, no se cumple en el caso del desarrollo de nuevas terapias, existiendo una importante brecha entre ambos conceptos [6]. Es, por tanto, necesario, desarrollar otras medidas y herramientas que faciliten el desarrollo y evaluación de nuevas terapias, así como la investigación básica. La interrelación entre estas herramientas, los requisitos básicos para su desarrollo y los objetivos marcados quedan reflejados en la **Figura 3**.

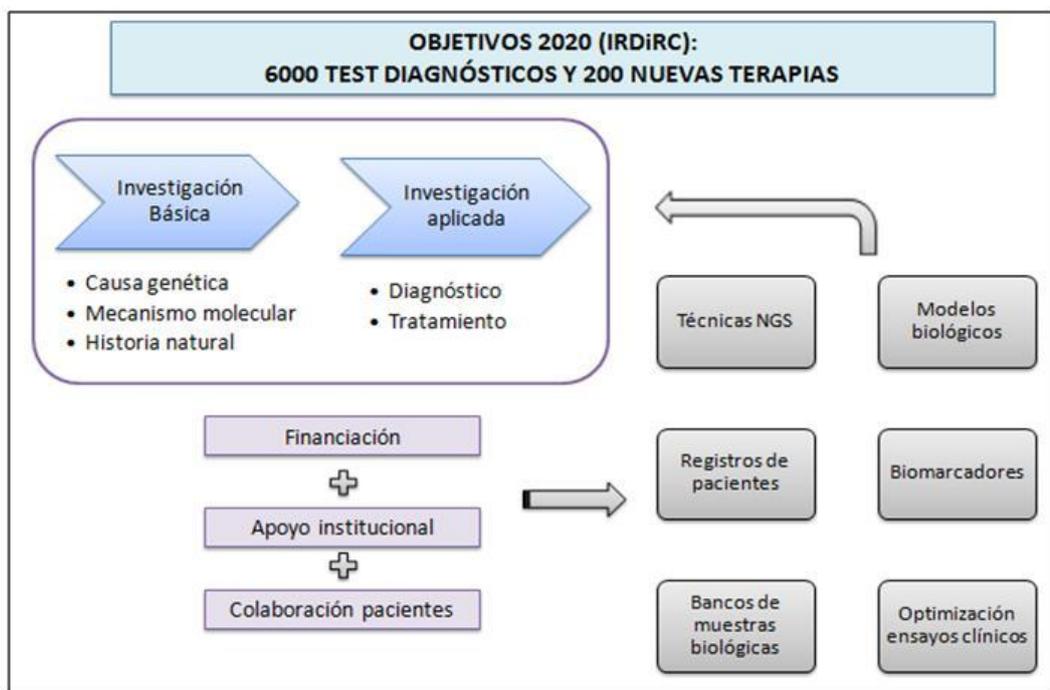


Figura 3 – Objetivos 2020 y herramientas básicas para alcanzarlos. Aspectos básicos necesarios remarcados por el IRDiRC y el *Institute Of Medicine of the National Academies* (IOM).

Registros de pacientes

La creación de registros de pacientes es un elemento fundamental para las enfermedades raras, desde la investigación básica o el desarrollo de medicamentos [17], hasta el establecimiento de medidas políticas o administrativas [31]. Actualmente, existe un gran número de registros de pacientes, desarrollados por asociaciones de pacientes, investigadores o instituciones. Por ejemplo, Orphanet identifica activos [32], solo en España, 46 registros distintos relacionados con enfermedades raras, con distintos niveles de cobertura: regional (11), nacional (31), europeo (3) y global (1)

En este sentido, es necesario establecer un criterio común tanto sobre la denominación y clasificación de las enfermedades [31], como sobre qué información de los pacientes es conveniente registrar. Además, teniendo en cuenta que la baja prevalencia lleva a una gran dispersión demográfica de los pacientes, es necesario fomentar la cooperación internacional, para facilitar el intercambio de la información recogida en los mismos [30]

Bancos de muestras biológicas

Los bancos de muestras biológicas específicos de enfermedades raras son otra herramienta fundamental tanto para la investigación básica como aplicada. EuroBioBank surge en 2003 financiado por la Comisión Europea con el objetivo de la creación de un catálogo de muestras, tanto DNA, como células y tejidos, de pacientes con enfermedades raras. Actualmente, 25 miembros de 7 países distintos forman parte del proyecto, cuya colección recoge ya 130.000 muestras distintas. Para los próximos años, EuroBioBank tiene como objetivo aumentar la diversidad de muestras, implementar estrategias que faciliten su uso por parte de los investigadores y conseguir la colaboración de nuevos miembros y países. Estos objetivos son similares a los planteados por IRDiRC [30], que añade la necesidad de establecer una regulación común para los bancos biológicos facilitando con ello el intercambio de información, y la necesidad de garantizar la sostenibilidad de estos bancos.

Modelos biológicos

El uso de modelos biológicos experimentales, como son levaduras, ratones o el pez cebra, permite tanto el estudio de causas genéticas y mecanismos moleculares de las enfermedades como la identificación de dianas terapéuticas y la evaluación de la eficacia y seguridad de nuevas terapias. En el caso de las enfermedades raras, la utilización de estos modelos supone una vía fundamental para que los estudios pre-clínicos de nuevas terapias

permitan alcanzar un nivel de evidencia suficiente como para autorizar un ensayo clínico [17]. Por ello, Orphanet destaca como infraestructuras de utilidad en enfermedades raras [33] distintos proyectos y entidades dedicados a obtener y coleccionar modelos experimentales, principalmente ratones, con mutaciones genéticas relacionadas con enfermedades humanas.

Biomarcadores

Los biomarcadores se definen como características biológicas medibles, que pueden utilizarse como indicadores de procesos biológicos normales o patogénicos. La aplicación principal de estos biomarcadores supone usarlos como predictores de los resultados en salud de una determinada intervención en ensayos clínicos, permitiendo optimizar dichos ensayos, aspecto que cobra especial importancia en estas enfermedades, cuyas características dificultan la toma de decisiones sobre el éxito o fracaso de las terapias en investigación mientras se lleva a cabo la intervención [30].

Para que sean útiles, no solo es necesario identificarlos, sino que deben ser validados y regulados. En este sentido, el IOM insta a la FDA a regular estos biomarcadores prestando especial atención a la flexibilidad necesaria en los requisitos de validación para aquellos biomarcadores de utilidad en patologías crónicas potencialmente mortales, como son las enfermedades raras [17].

Diseño de los ensayos clínicos

Los ensayos clínicos aleatorizados con grupo control y de intervención son, sin duda, los que permiten obtener una evidencia más robusta. Sin embargo, en estas enfermedades, no solo es difícil el planteamiento de este tipo de ensayos desde un punto de vista logístico-técnico, sino que además suponen un dilema ético importante [34]. El diseño cruzado, el N=1 o el factorial permiten mantener la aleatorización y reducen parte de la problemática ética ya que todos los pacientes reciben, antes o después, las mismas intervenciones. Otra opción, a combinar con los diseños anteriores, es utilizar el concepto de *early-scape* y/o *play-the-winner* [35]. Para que estos diseños y sus combinaciones permitan obtener una evidencia estadística suficiente es primordial que la elección del diseño sea la óptima teniendo en cuenta las características individuales de cada enfermedad y de cada intervención a realizar. Para ello, se están desarrollando modelos de simulación de ensayos clínicos.

Un ejemplo de estas nuevas herramientas de simulación es el proyecto CRESim (Child-Rare-Euro-Simulation), que está llevando a cabo el PriomedChild. Este proyecto tiene

como objetivo la creación de una plataforma que permita la simulación de ensayos clínicos para identificar el diseño óptimo para la evaluación de medicamentos en desarrollo para enfermedades raras en niños. En primer lugar, recogen toda la información disponible sobre la enfermedad para caracterizar su historia natural. Paralelamente, utilizan los modelos ya existentes para el estudio de farmacocinética y farmacodinamia de medicamentos y los integran en un único modelo que permita, virtualmente, predecir el efecto de los medicamentos. Por último, llevan a cabo una simulación de ensayos clínicos teniendo en cuenta las distintas opciones de diseño, realizando un análisis estadístico de estas en cuanto a número de paciente, potencia, variabilidad de resultados, etc. Con ello pretenden, finalmente, obtener una evidencia estadística sobre el diseño de ensayo clínico óptimo para cada enfermedad y cada medicamento.

V. Conclusiones

La situación actual de las enfermedades raras se caracteriza por la demora diagnóstica y la escasez de tratamientos. Las nuevas técnicas NGS han cambiado radicalmente la situación y expectativas de estas enfermedades. Sus distintos ámbitos y métodos de aplicación son remarcados en prácticamente todas las revisiones y publicaciones sobre estas enfermedades de los últimos 5 años. El impacto de las NGS y las diferentes herramientas citadas en este estudio, han supuesto una reducción drástica de las limitaciones técnico-científicas en la investigación, con un aumento exponencial en el número de causas genéticas conocidas y test diagnósticos disponibles. Las iniciativas en marcha para seguir impulsando estas herramientas permiten suponer que dicha tendencia se mantendrá en los próximos años, y que aumentará también el ritmo de desarrollo de nuevas terapias. No obstante, para que dicho cambio se refleje de manera más eficaz en el ámbito clínico-asistencial, será imprescindible la cooperación internacional y el apoyo institucional, permitiendo garantizar tanto el avance en el desarrollo de test diagnósticos y terapias, como el acceso de los pacientes a los mismos.

Bibliografía

1. Huyard C. How did uncommon disorders become ‘rare diseases’? History of a boundary object. *Sociol Health Illn.* 2009; 31(4): 463–477
2. Comisión Europea, Dirección General de Sanidad y Protección de los consumidores. Programa de acción comunitaria sobre las enfermedades poco comunes (1999-2003). Decisión nº 1295/99/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 1999.
3. Comisión de las Comunidades Europeas. Libro blanco, Juntos por la salud: un planteamiento estratégico para la UE (2008-2013). Bruselas; 2007.
4. European Organization for Rare Diseases, EURORDIS. The Voice of 12,000 Patients: Experiences and expectations of rare diseases patients on diagnosis and care on Europe. Francia: EURORDIS; febrero 2009.
5. Posada M, Martín-Arribas C, Ramírez A, Villaverde A, Abaitua A. Enfermedades raras. Concepto, epidemiología y situación actual en España. *An Sist Sanit Navar.* 2008; 31 (2): 9-20.
6. Boycott KM, Vanston MR, Bulman DE, MacKenzie AE. Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: discovery to translation. *Nat Rev Genet.* 2013; 14 (10): 681-691
7. Artuch R, Moreno J, Puig RM, Quintana M, Montero R, Ormazábal A, et al. El laboratorio en el diagnóstico de las enfermedades raras. *An Sist Sanit Navar.* 2008; 31 (2): 91-103.
8. Federación Española de Enfermedades Raras, FEDER. Estudio sobre situación de Necesidades Sociosanitarias de las personas con Enfermedades Raras en España, Estudio ENSERio. Madrid: FEDER; octubre 2009.
9. Shire PLC. Rare Disease Impact Report: Insights from patients and the medical community. Massachusetts: Shire PCL; abril 2009.
10. Prevalence of rare diseases, Lista por orden de prevalencia decreciente o por número de casos. Informes Periódicos de Orphanet, Serie Enfermedades Raras [Internet]; Mayo 2014, disponible en: http://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/ES/Prevalencia_de_las_enfermedades_raras_por_prevalencia_decreciente_o_casos.pdf
11. Reglamento (CE) nº 141/2000 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de Diciembre de 1999, sobre medicamentos huérfanos. Publicado en el Diario Oficial de la Unión Europea el 22 de Enero de 2000.
12. Fontana D, Uema S, Mazzieri MR. Medicamentos huérfanos: una revisión necesaria para un problema sanitario no resuelto. *Acta Farm. Bonaerense.* 2005; 24 (1): 123-9
13. Rare Disease (orphan) Designation [Internet]. London: European Medicines Agency – [citado 15 de enero de 2015]. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/landing/orphan_search.jsp&mid=WC0b01ac058001d12b
14. Search Orphan Drug Designations and Approvals [Internet]. Maryland: U.S. Food and Drug Administration – [citado 15 de enero de 2015]. Disponible en: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/opdlisting/ood>
15. González-Meneses A, Benavides J, Fernandez A, Fernandez R, Garcia A, Garcia P, et al. Plan de atención a personas afectadas por enfermedades raras (2008-2012). Sevilla: Consejería de Salud; 2007.
16. Listados de medicamentos para enfermedades raras en Europa. Informes Periódicos de Orphanet, Serie Medicamentos Huérfanos [internet]; Octubre 2014, disponible en http://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/ES/listado_de_medicamentos_huerfanos_in_Europa.pdf

17. Committee on Accelerating Rare Diseases Research and Orphan Product Development, Institute of Medicine of the national Academies. Rare Diseases and Orphan Products: Accelerating Research and Development. Washington: The National Academies Press; 2010.
18. Posada M. La investigación en enfermedades raras en Europa y el Consorcio Internacional de Investigación. En: Jornada Enfermedades Raras, 13 diciembre de 2013. Disponible en: http://www.ajs.es/files/eventos/2013/jornada-er/documentos/3_La_investigacion_en_enfermedades%20raras_en_Europa.pdf
19. Bell S, Tudur C. A comparison of interventional clinical trials in rare versus non-rare diseases: an analysis of ClinicalTrials.gov. Orphanet J Rare Dis. [Internet]. 2014; 9:170 . Disponible en: <http://www.ojrd.com/content/9/1/170>
20. Mardis ER. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. Trends Genet. 2008; 24 (3): 133-141
21. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. Nat Biotechnol. 2008; 26 (10): 1135-1145
22. Illumina, Specification sheet: Hi Seq 3000/ Hi Seq 4000 Sequencing Systems. 2015. Disponible en: <http://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/hiseq-3000-4000-specification-sheet-770-2014-057.pdf>
23. Roche Diagnostics GmbH. Specification sheet:GS FLX+ System. 2011. Disponible en: http://454.com/downloads/GSFLXApplicationFlyer_FINALv2.pdf
24. Applied Biosystems. Specification sheet: SOLiD 4 System. 2010. Disponible en: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/global_marketing_group/documents/generaldocuments/cms_078637.pdf
25. Dijk E, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. Trends Genet. 2014; 30 (9):419-426
26. Xuan J, Yu Y, Qing T, Guo L, Shi L. Next-generation sequencing in the clinic: Promises and challenges. Cancer Lett. 2013; 340: 284–295
27. EuroGentest. Guideliness for diagnostic next generation sequencing. Final draft; Diciembre 2014.
28. American College of Medical Genetics and Genomics. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. Genet Med. 2013; 15 (9): 733-747
29. Raffan E, Semple R. Next generation sequencing - implications for clinical practice. Br Med Bull. 2011; 99: 53–71
30. International Rare Diseases Research Consortium, IRDDiRC. Polices and guidelines, Long Version. Abril 2013
31. Estrategia en enfermedades raras del Sistema Nacional de Salud. Madrid: Ministerio de Sanidad y Política Social; 2009.
32. Rare Disease Registries in Europe. Orphanet Report Series, Rare Diseases collection [Internet]; enero 2015, disponible en: <http://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/GB/Registries.pdf>
33. List of research infrastructures useful to rare diseases in Europe. Orphanet Report Series, Rare Diseases collection [Internet]; enero 2015 http://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/GB/Research_Infrastructures_for_rare_diseases_in_Europe.pdf
34. Griggs R, Batshaw M, Dunkle M, Gropal-Srivastava R, Kaye E, Krischer J, et al. Clinical research for rare disease: opportunities, challenges, and solutions. Mol Genet Metab. 2009; 96 (1): 20–26.
35. Nony P, Kurbatova P, Bajard A, Malik S, Castellán C, Chabaud S, et al. A methodological framework for drug development in rare diseases. Orphanet J Rare Dis. [Internet] 2014; 9 (1):164 Disponible en <http://www.ojrd.com/content/9/1/164>