



Fundació
La Marató de TV3
XVI SIMPOSIUM
Malalties minoritàries

Desenvolupament de nous tractaments per a la distròfia miotònica: descobriment de fàrmacs *in vivo*

Dr. Rubén Darío Artero Allepuz

Universitat de València. Facultat Ciències Biològiques UV

Dr. José Ignacio Borrell Bilbao

Universitat Ramon Llull. Escola Tècnica Superior IQS

Dr. Josep Castells Boliart

Institut Universitari Ciència i Tecnologia Mollet





1. Resum del projecte

Marc teòric / Objectiu principal

Ens proposàvem la identificació i el disseny de noves molècules com a futurs agents terapèutics en distròfia miotònica tipus 1 (DM1); OMIM 160900; prevalença mundial (1/8.000), atès que actualment no hi existeix cap teràpia eficaç. La DM1 és una malaltia neuromuscular que es desenvolupa amb miotonia, debilitat, degeneració muscular i dolor. És, de manera característica, multisistèmica, tot incloent trastorns cardiovasculars, digestius, hiperinsulinèmia i cataractes, entre d'altres.

La DM1 és una malaltia genètica que s'associa a una expansió anormal (>50) de repeticions del trinucleòtid CTG en una regió no codificant del gen *DMPK*. Quan aquest gen s'expressa, genera molècules d'RNA en les quals les expansions CUG es pleguen en una estructura secundària de tipus forqueta que segresta proteïnes nuclears, en particular MBNL1, alhora que l'expressió de *DMPK* no sembla estar compromesa.

Metodologia general

Ens hem plantejat l'abordatge de tres estratègies combinades: (1) rastreig massiu de compostos amb propietats *drug-like*; disseny computacional, síntesi i determinació de l'activitat biològica d'inhibidors potencials de (2) la unió d'MBNL1 a la forqueta de repeticions CUG i (3) d'inhibidors potencials del plegament de la forqueta. Les molècules s'han assajat en models per a la malaltia prèviament establerts en *Drosophila*. Els resultats positius s'han validat en un model cel·lular de la malaltia. Aquest abordatge és possible atesa la multidisciplinarietat del grup, les eines ja desenvolupades i resultats previs obtinguts en rastreigs equivalents *in vivo*.

Els objectius generals (SA) del projecte coordinat han estat:

SA1. Generació de diversitat química, mitjançant tres estratègies complementàries.

SA2. Cribratge *in vivo* de supressors químics en els models de la malaltia en *Drosophila*.

SA3. Validació de l'activitat en *Drosophila*.

SA4. Validació de l'activitat en models mamífers de la malaltia.

SA5. Mecanisme d'acció dels compostos més interessants (*leads*).

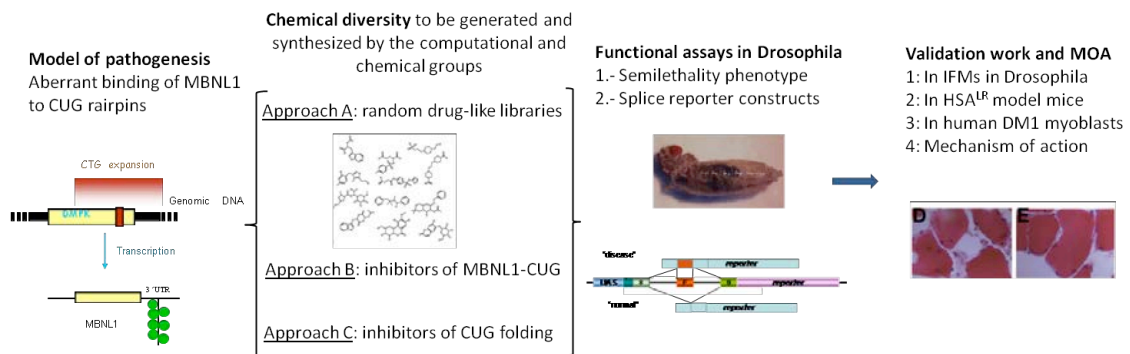


Figura 1. Esquema del pla de treball general. El primer objectiu s'orienta cap a la generació de la diversitat química mitjançant tres enfocaments complementaris. La diversitat química generada pel grup computacional serà sintetitzada pel grup químic del consorci i testat *in vivo* en models de *Drosophila*. Les activitats inicials seran validades *in vivo* en *Drosophila* i en models mamífers i s'explorarà el mecanisme d'acció dels compostos prometedors.

2. Resultats

Els principals resultats assolits han estat:

1. Mitjançant simulacions per dinàmica molecular s'ha desenvolupat un model computacional de forqueta CUG que ha permès concloure que el nombre de repeticions CUG afecta directament la conformació dels parells U-U no canònics.

2. D'un total de 779 compostos provats en un model de distròfia miotònica (DM) en *Drosophila* per a la recuperació d'un episodi d'*splicing* anormal (mosques minigen:luc; descrites en GARCIA-ALCOVER *et al.*, 2014), hem identificat 3 prototips o

hits (IUCT-309, IUCT-290 i IUCT-169) que considerem interessants per desenvolupar posteriorment com a *leads* per a DM. Aquesta taxa d'èxit, aproximadament 4/1.000, està en línia amb el que s'observa en cribratges independents realitzats al laboratori biofarmacèutic Valentia BioPharma.

3. Hem aportat evidència experimental de la unió en repeticions CUG per part de molècules identificades *in silico* en un model de cribratge virtual desenvolupat pel soci IQS, que ha permès definir les sèries LR, RP i TFL, mitjançant mesuraments de polarització de la fluorescència *in vitro*. Aquestes dades es correlacionen bé amb les prediccions biofísiques i estableixen un llindar d'unes 100 kcal/mol per tal de considerar probable la unió a les forquetes CUG.

4. Hem aportat evidència experimental de l'activitat en un model cel·lular de la malaltia basat en fibroblasts de pell transdiferenciats a mioblasts, en els quals s'han assajat tots els *hits* identificats, tot trobant canvis significatius en el nombre de *foci* per cèl·lula i/o nombre de cèl·lules sense *foci*, i resposta a dosi, en tots els casos. Associats a aquests resultats hi ha les dades de toxicitat en mioblasts (IC₅₀) i de solubilitat en aigua.

5. Per a LR08 i RP33 disposem d'evidència preliminar amb mioblasts humans que suggereix que aquestes molècules aconseguen alliberar MBNL1 del seu segrest per part de les repeticions.

6. Disposem d'evidència preliminar que suggereix que els *hits* identificats actuarien almenys a través de dos mecanismes d'acció diferents. Així, els compostos IUCT-309, IUCT-290 i IUCT-169 no s'uneixen a les repeticions i sembla que activen la transcripció de *musclebind* endogen (dades no mostrades), mentre que la resta de *hits* podrien competir amb la unió d'MBNL1 a repeticions i/o estabilitzar les repeticions en una conformació que inhibeix l'esmentada interacció.

3. Rellevància i possibles implicacions

En el projecte es plantejava la cerca de fàrmacs que potencialment donessin lloc a teràpies farmacològiques per al tractament de la distròfia miotònica. La rellevància i implicacions clíniques dels resultats globals obtinguts es poden resumir en els punts següents:

1. S'ha desenvolupat un model computacional de forquetes CUG que ha servit, no tan sols per identificar *hits* inicials (sèries LR, RP i TFL), sinó també com a eina per continuar treballant en llur optimització química. S'han posat a punt diverses metodologies per una avaluació eficient d'activitat, en particular un sistema In Cell Analyzer, per a quantificació automàtica de *foci* en un model cel·lular de la malaltia.

2. Els rastreigs *in vivo* i *in silico* han identificat una sèrie de *hits* inicials amb els quals continuarem treballant en el desenvolupament de fàrmacs. En particular els *hits* identificats han estat: IUCT-309, IUCT-290, IUCT-169, sèrie LR, sèrie RP i sèrie TFL.

3. Com a continuació del projecte, hem aconseguit una Acció Especial en Salut de l'Institut de Salut Carlos III (ref. PI13/00386), a fi de millorar els paràmetres d'activitat, solubilitat i toxicitat dels *hits* LR, RP i TFL abans esmentats. Sota la direcció científica del prof. Manuel Pérez Alonso, membre del nostre grup d'investigació, aquest projecte agrupa els socis acadèmics IQS Universitat Ramon Llull i Genómica Traslacional (Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA), així com els laboratoris biofarmacèutics IUCT (del grup Inkemia IUCT Group) i Valentia BioPharma.

4. Ha estat possible presentar dues sol·licituds de patent prioritària europea, referències EP14382450 (sobre *hit* IUCT-309) i EP14382449 (sobre la sèrie o família TFL), ambdues amb data de prioritat 14/11/14.

5. Actualment estem valorant la conveniència de presentar noves sol·licituds de patent que protegeixin el desenvolupament de *hits* addicionals (IUCT-290 i IUCT-169) com a nous fàrmacs per a distròfia miotònica.

6. Arran d'aquests resultats, existeix una companyia biotech interessada en el desenvolupament i la producció posterior d'aquests compostos.

En conclusió, i més enllà dels resultats concrets abans esmentats, el projecte ha servit per establir una cooperació publicoprivada duradora al voltant del desenvolupament de fàrmacs per a distròfia miotònica. Fruit d'aquesta col·laboració serà possible que els primers resultats obtinguts es transformin a curt/mitjà termini en productes que puguin beneficiar les persones afectades per distròfia miotònica.

4. Bibliografia científica generada

Atesa la naturalesa de la investigació duta a terme, hem prioritzat a curt termini la protecció mitjançant patents, respecte de les publicacions científiques, de manera que ens permet tant la translació al sector biotecnològic com l'avenç en el desenvolupament químic dels *hits*. Tanmateix, en aquest moment estem en fase de redacció d'un article en què es descriurà el model computacional generat, la seva aplicació en el descobriment de fàrmacs i la validació en assajos *in vivo*. S'han presentat dues comunicacions a congressos:

A. López-González, R. Estrada-Tejedor, J. Borrell, J. Teixidó.

Biomolecules modeling implied in myotonic dystrophy type 1 for structure based drug design

RICT 2013 - Drug Discovery and Selection, 3-5 Jul 2013, Niça.

A. López-González, R. Estrada-Tejedor, J. Borrell, J. Teixidó.

Biomolecules modeling implied in myotonic dystrophy type 1 for structure based drug design

International myotonic dystrophy consortium meeting, IDMC-9, 16-19 Oct 2013, Sant Sebastià.