



**Fundació**  
La Marató de TV3  
XVI SIMPOSIUM  
Enfermedades minoritarias

## **Desarrollo de nuevos tratamientos para la distrofia miotónica: descubrimiento de fármacos *in vivo***

**Dr. Ruben Dario 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. Resumen del proyecto

### Marco teórico / Objetivo principal:

Proponíamos la identificación y diseño de nuevas moléculas como futuros agentes terapéuticos en distrofia miotónica tipo 1 (DM1; OMIM 160900; prevalencia mundial 1/8.000), dado que no existe en la actualidad terapia eficaz alguna. La DM1 es una enfermedad neuromuscular que cursa con miotonía, debilidad, degeneración muscular y dolor. Es, de forma característica, multisistémica, incluyendo trastornos cardiovasculares, digestivos, hiperinsulinemia y cataratas, entre otros.

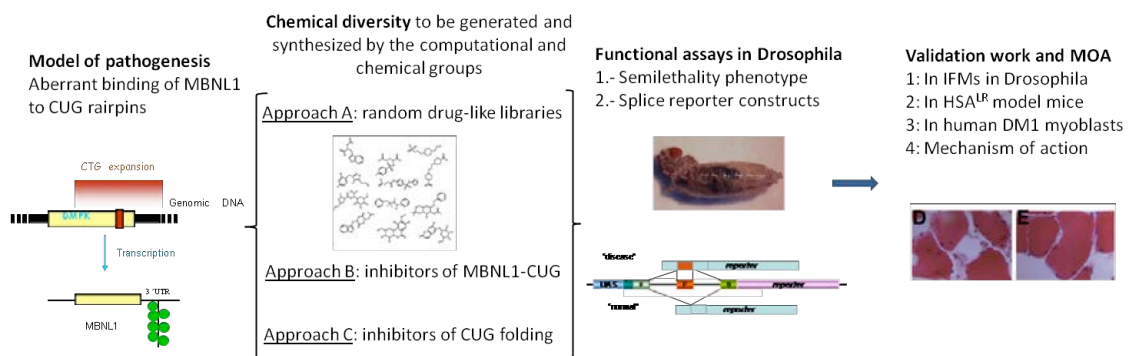
La DM1 es una enfermedad genética que se asocia con una expansión anormal (>50) de repeticiones del trinucleótido CTG en una región no codificante del gen *DMPK*. Cuando este gen se expresa, genera moléculas de RNA en las que las expansiones CUG se pliegan en una estructura secundaria de tipo horquilla que secuestra proteínas nucleares, en particular MBNL1, mientras que la expresión de *DMPK* no parece comprometida.

### Metodología general:

Planteamos el abordaje de tres estrategias combinadas: (1) rastreo masivo de compuestos con propiedades *drug-like*; diseño computacional, síntesis y determinación de la actividad biológica de inhibidores potenciales de (2) la unión de MBNL1 en la horquilla de repeticiones CUG y (3) de inhibidores potenciales del plegamiento de la horquilla. Las moléculas se han testado en modelos para la enfermedad previamente establecidos en *Drosophila*. Los positivos se han validado en un modelo celular de la enfermedad. Este abordaje es posible dada la multidisciplinariedad del grupo, las herramientas ya desarrolladas y resultados previos en rastreos equivalentes *in vivo*.

Los objetivos generales (SA) del proyecto coordinado han sido los siguientes:

- SA1. Generación de diversidad química, mediante tres estrategias complementarias.
- SA2. Cribado *in vivo* de supresores químicos en los modelos de la enfermedad en *Drosophila*.
- SA3. Validación de la actividad en *Drosophila*.
- SA4. Validación de la actividad en modelos mamíferos de la enfermedad.
- SA5. Mecanismo de acción de los compuestos prometedores (*leads*).



**Figura 1.** Esquema del plan de trabajo general. El primer objetivo se dirige a la generación de la diversidad química conforme a tres enfoques complementarios. La diversidad química generada por el grupo computacional será sintetizada por el grupo químico del consorcio y testado *in vivo* en modelos en *Drosophila*. Las actividades iniciales serán validadas *in vivo* en *Drosophila* y en modelos mamíferos y se explorará el mecanismo de acción de compuestos prometedores.

## 2. Resultados

Los principales resultados alcanzados han sido:

1. Se ha desarrollado mediante simulaciones de dinámica molecular un modelo computacional de horquilla CUG que ha permitido concluir que el número de repeticiones CUG afecta directamente a la conformación de los pares U-U no canónicos.

2. De un total de 779 compuestos testados en un modelo de distrofia miotónica (DM) en *Drosophila* para la recuperación de un suceso de *splicing* anormal en un modelo de distrofia miotónica (DM) en *Drosophila* (moscas minigen:luc; descritas en GARCIA-ALCOVER *et al.*, 2014), hemos identificado 3 *hits* (IUCT-309, IUCT-290 y IUCT-169) que consideramos interesantes para su desarrollo ulterior como *leads* para DM. Esta tasa de éxito, aproximadamente 4/1.000, está en línea con lo observado en cribados independientes en el laboratorio biofarmacéutico Valentia BioPharma.

3. Hemos aportado evidencia experimental de unión a repeticiones CUG por parte de moléculas identificadas *in silico* en un modelo de cribado virtual desarrollado por el socio IQS, contribuyendo a definir las series LR, RP y TFL, mediante medidas de polarización de la fluorescencia *in vitro*. Estos datos se correlacionan bien con las predicciones biofísicas y establecen un umbral de unas 100 kcal/mol para considerar probable la unión a horquillas CUG.

4. Hemos aportado evidencia experimental de actividad en un modelo celular de la enfermedad basado en fibroblastos de piel transdiferenciados a mioblastos, en los que se han testado todos los *hits* identificados, encontrando cambios significativos en el número de *foci* por célula y/o número de células sin *foci*, y respuesta a dosis, en todos los casos. Asociados a estos resultados hay datos de toxicidad en mioblastos (IC<sub>50</sub>) y de solubilidad en agua.

5. Para LR08 y RP33 disponemos de evidencia preliminar con mioblastos humanos que sugiere que estas moléculas consiguen liberar MBNL1 de su secuestro por las repeticiones.

6. Disponemos de evidencia preliminar que sugiere que los *hits* identificados actuarían por al menos dos mecanismos de acción distintos. Mientras los compuestos IUCT-309, IUCT-290 e IUCT-169 no se unen a repeticiones y parecen activar la transcripción de *muscleblind* endógeno (datos no mostrados), el resto de

*hits* podrían competir con la unión de MBNL1 a repeticiones y/o estabilizar las repeticiones en una conformación que inhibe dicha interacción.

### 3. Relevancia y posibles implicaciones

En el presente proyecto se planteaba la búsqueda de fármacos que potencialmente dieran lugar a terapias farmacológicas para el tratamiento de la distrofia miotónica. La relevancia e implicaciones clínicas de los resultados globales obtenidos pueden resumirse en los siguientes puntos:

1. Se ha desarrollado un modelo computacional de horquillas CUG que ha servido no solo para identificar *hits* iniciales (series LR, RP y TFL), sino también como herramienta para seguir trabajando en la optimización química de los mismos. Se han puesto a punto diferentes metodologías para una evaluación eficiente de actividad, en particular un sistema In Cell Analyzer, para cuantificación automática de *foci* en un modelo celular de la enfermedad.
2. Los rastreos *in vivo* e *in silico* han identificado una serie de *hits* iniciales con los que continuaremos trabajando en el desarrollo de fármacos, en particular los *hits* han sido IUCT-309, IUCT-290, IUCT-169, serie LR, serie RP y serie TFL.
3. Como continuación de este proyecto, hemos obtenido una Acción Especial en Salud del Instituto de Salud Carlos III (ref. PI13/00386), con el propósito de mejorar los parámetros de actividad, solubilidad y toxicidad de los *hits* LR, RP y TFL anteriores. Bajo la dirección científica del prof. Manuel Pérez Alonso, miembro de nuestro grupo de investigación, este proyecto agrupa a los socios académicos IQS (Universitat Ramon Llull) y Genómica Traslacional (Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA), así como los laboratorios biofarmacéuticos IUCT (del grupo Inkemia IUCT Group) y Valentia BioPharma.

4. Ha sido posible presentar dos solicitudes de patente prioritaria europea, con referencias EP14382450 (sobre *hit* IUCT-309) y EP14382449 (sobre la serie o familia TFL), ambas con fecha de prioridad 14/11/14.

5. En la actualidad estamos valorando la conveniencia de nuevas solicitudes de patente que protejan el desarrollo de *hits* adicionales (IUCT-290 y IUCT-169) como nuevos fármacos para distrofia miotónica.

6. A raíz de estos resultados, existe una compañía biotecnológica interesada en el desarrollo y producción posterior de estos compuestos.

En síntesis, y más allá de los resultados concretos arriba mencionados, el proyecto ha servido para establecer una cooperación público-privada duradera en torno al desarrollo de fármacos para distrofia miotónica. Fruto de esta colaboración va a ser posible que los primeros resultados obtenidos se transformen a corto/medio plazo en productos que puedan beneficiar a las personas afectadas por distrofia miotónica.

#### **4. Bibliografía científica generada**

Debido a la naturaleza de la investigación realizada, hemos priorizado a corto plazo la protección mediante patentes, respecto a las publicaciones, lo cual permite tanto su traslación al sector biotecnológico como el avance en el desarrollo químico de los *hits*. No obstante, en este momento estamos en fase de redacción de un artículo que describirá el modelo computacional generado, su aplicación en el descubrimiento de fármacos y su validación en ensayos *in vivo*. Asimismo, se han realizado las siguientes comunicaciones a congresos:

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, Niza.

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, San Sebastián.