



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 365 967**

② Número de solicitud: 201030462

⑤ Int. Cl.:  
**A61K 38/08** (2006.01)  
**C07K 7/06** (2006.01)  
**A61P 25/14** (2006.01)  
**A61P 21/00** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **26.03.2010**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **14.10.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**14.10.2011**

⑰ Solicitante/s: **Universitat de Valencia**  
**OTRI-Avda. Blasco Ibañez, 13**  
**46010 Valencia, ES**  
**Fundación de la Comunidad Valenciana CENTRO**  
**DE INVESTIGACIÓN PRINCIPE FELIPE y**  
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas**

⑱ Inventor/es: **Artero Allepuz, Rubén Darío;**  
**García López, Amparo;**  
**Orzáez Calatayud, María del Mar;**  
**Llamusí Troisi, María Beatriz;**  
**Pérez Payá, Enrique y**  
**Pérez Alonso, Manuel**

⑳ Agente: **Illescas Taboada, Manuel**

② Título: **Compuestos para ser usados en el tratamiento de enfermedades basadas en la expresión de transcritos tóxicos con repeticiones CUG o CCUG.**

③ Resumen:

Compuestos para ser usados en el tratamiento de enfermedades basadas en la expresión de transcritos tóxicos con repeticiones CUG o CCUG. La presente invención hace referencia a moléculas peptídicas, concretamente hexapéptidos, para la prevención y/o tratamiento de enfermedades cuya etiología se basa en la presencia de transcritos tóxicos que comprenden repeticiones CUG o CCUG, preferentemente: DM1, DM2 y SCA8.

ES 2 365 967 A1

## DESCRIPCIÓN

Compuestos para ser usados en el tratamiento de enfermedades basadas en la expresión de transcritos tóxicos con repeticiones CUG o CCUG.

**Campo de la invención**

La presente invención hace referencia a compuestos que comprenden hexapéptidos, para ser usados en la prevención y/o tratamiento de enfermedades cuya etiología se basa en la expresión de transcritos tóxicos que comprenden repeticiones CUG o CCUG como, por ejemplo, Distrofia Miotónica tipo 1 (DM1), Distrofia Miotónica tipo 2 (DM2) y Ataxia Espinocerebelar de tipo 8 (SCA8).

Por lo tanto la presente invención puede ser englobada en el campo de la medicina en general y más específicamente en el campo relacionado con la prevención y/o tratamiento de enfermedades genéticas de carácter hereditario.

**Estado de la técnica**

La DM1 o enfermedad de Steinert (DM1, OMIM #160900) es el tipo de distrofia muscular más frecuente en la población adulta con una prevalencia mundial de aproximadamente 1 paciente cada 8000 personas, siendo clasificada como enfermedad rara. Es una enfermedad neuromuscular, con síntomas definitorios que afectan principalmente al músculo, tales como miotonía y debilidad muscular, aunque es característicamente multisistémica viéndose afectados entre otros órganos y sistemas el sistema cardiaco (arritmias cardiacas), el ocular (cataratas), el endocrino (hiperinsulinemia) y el sistema reproductor (hipogonadismo).

A nivel genético la DM1 presenta un patrón de herencia autosómico dominante, penetrancia alta y expresividad variable. El origen de la enfermedad está en una mutación dinámica en la región 3' no traducida (3'UTR) del gen proteína quinasa de la distrofia miotónica (DMPK, Entrez #1760), localizada en la región cromosómica 19q13.2-q13.3. Dicha mutación consiste en una expansión anormal de repeticiones del trinucleótido CTG en el exón 15 de dicho gen DMPK, que en la población sana aparece en número variable de entre 5-35 copias, mientras que en los pacientes se encuentra en número mayor de 50. El número de tripletes CTG correlaciona con la gravedad de los síntomas y edad a la que éstos aparecen. Así, para los casos en los que el número de repeticiones oscila entre 50 y unos pocos cientos se habla de DM1 de inicio adulto, donde las primeras manifestaciones clínicas suelen aparecer en la segunda década de vida. Para los casos en los que el número de repeticiones es mayor, alcanzando incluso los miles de copias, la patología se manifiesta ya desde el nacimiento en forma de DM congénita (DMC o enfermedad de Thomsen), siendo ésta la variante más grave de la enfermedad, con síntomas como retraso mental, trastornos respiratorios y problemas en la diferenciación muscular, entre otros.

En los últimos años, se han propuesto una serie de hipótesis en relación a mecanismos moleculares relacionados con la patogénesis de la DM1, siendo uno de los más consensuados la ganancia de función tóxica del ARN. Según este mecanismo los ARNs portadores de expansiones CUG forman horquillas que resultan tóxicas para las células que las expresan provocando, entre otras alteraciones moleculares, cambios en el splicing alternativo de transcritos definidos, por secuestro de factores reguladores del mismo. Un apoyo decisivo para esta hipótesis proviene del trabajo de Mankodi *et al.* (2000) en ratones transgénicos. Dichos ratones expresan aproximadamente 250 repeticiones del trinucleótido CUG en un ARNm heterólogo desarrollando miotonía y defectos musculares típicos de la DM1, demostrando que las expansiones CUG ejercen un efecto tóxico por sí mismas independientemente del contexto en el que estén (Mankodi *et al.*, 2000). Posteriormente, otros modelos generados en *Drosophila* confirmaron la toxicidad de las repeticiones CUG independientemente de DMPK (García-López *et al.*, 2008).

Desde el descubrimiento de que ARNs con expansiones CUG pueden resultar tóxicos para las células, toda una serie de evidencias científicas apoyan que estas expansiones, o expansiones parecidas, en otros ARNs, pueden originar patologías genéticas hereditarias semejantes a la DM1. Por ejemplo, en la DM2, las expansiones del tetranucleótido CCUG en el primer intrón de los ARNs transcritos del gen ZNF9 (proteína de dedos de zinc 9, Entrez #7555) desencadenan una patología muy semejante a la DM1 (OMIM #602668). De hecho en el estado de la técnica es conocida la existencia de genes relacionados con la función nerviosa que presentan niveles alterados tanto en pacientes de DM1 como de DM2, lo cual apoya la idea de un mecanismo de patogénesis común a ambas enfermedades.

Por su parte, la ataxia espinocerebelar tipo 8 (SCA8, OMIM #603680) es una enfermedad neurodegenerativa causada por la expansión de tripletes CTG en un transcrito no codificante del gen SCA8. Se ha visto que la transcripción bidireccional de este gen conduce tanto a la expresión de ARNs con expansiones CUG (no traducidos), que desencadenan alteraciones moleculares relacionadas con las descritas para la DM1, como a transcritos con expansiones CAG que se traducen en proteínas con poliglutaminas.

En el núcleo, los ARNs portadores de expansiones CUG se pliegan formando una estructura en horquilla capaz de unir y secuestrar factores de unión al ARN, formando grandes inclusiones ribonucleoproteicas. Hasta la fecha, se ha descrito que las repeticiones CUG interfieren con la actividad de un número creciente de proteínas nucleares, las cuales incluyen factores de transcripción y factores de *splicing* alternativo. Entre éstos últimos se encuentran las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares hnRNP F y hnRNP H, así como las proteínas de la familia MBNL1-3 (Muscleblind-like proteins). Debido a este secuestro, los pacientes presentan alteraciones en el procesado alternativo

de centenares de transcritos específicos, lo que llevó a acuñar el término de espliceopatía, para la cual la DM es el primer ejemplo descrito. También se ha propuesto que la actividad de distintos microARNs podría verse alterada.

El secuestro de proteínas nucleares impide a las mismas realizar sus funciones normales en la célula. Se han aislado y caracterizado varias proteínas capaces de unirse a horquillas CUG de doble cadena tanto *in vitro* como *in vivo*. Entre ellas destacan factores de transcripción como la proteína de especificidad 1 (Sp1), el receptor gamma del ácido retinoico (RAR $\gamma$ ) o los miembros de la familia de transductores de señal y activadores de la transcripción STAT1 y STAT3. Algunos de estos factores pueden llegar a sufrir un secuestro de hasta el 90% en células DM1 en cultivo, lo cual les impide activar la transcripción de sus genes diana, disminuyendo así su expresión.

Otros factores de transcripción alterados en la DM1 son NKX2-5 y MyoD. Estas proteínas están relacionadas con el desarrollo y conducción cardíaca, y con la diferenciación de mioblastos, respectivamente. Los niveles de NKX2-5 están aumentados en los pacientes, mientras que MyoD está reducida. El motivo por el cual los niveles de estos factores de transcripción están desregulados, así como su relación con la formación de horquillas CUG, se desconoce.

Hasta la fecha varios trabajos han demostrado que las repeticiones CUG afectan a la expresión de un gran número de genes. Utilizando microarrays de ratón, se han detectado al menos 175 transcritos musculares alterados por la expresión de transcritos CUG expandidos. Además, al menos 128 transcritos están también desregulados en ratones knockout de MBNL1, sugiriendo que el secuestro y subsiguiente pérdida de función de MBNL1 juega un papel crucial en la enfermedad.

Los ratones knockout de MBNL1 presentan cataratas del tipo iridiscente, sufren miotonía y defectos histológicos a nivel muscular. Los ratones knockout de MBNL2 también desarrollan miotonía (por un procesado incorrecto de los transcritos Clcn-1) y otras alteraciones musculares típicas de la DM1. Además, la sobreexpresión de MBNL1 en ratones modelo que expresan 250 repeticiones CTG revierte los defectos en el procesado de al menos 4 transcritos (Serca1, Clcn1, Tnnt3 y ZASP), así como la miotonía. En *Drosophila*, los embriones mutantes *mbl* presentan desorganización de las bandas Z de los sarcómeros, hipercontracción del abdomen y alteraciones en el procesado alternativo de transcritos como ZASP, troponina T (tnT) y la  $\alpha$ -actinina. Del mismo modo, la sobreexpresión de MBNL1 en moscas modelo que expresan 480 repeticiones CTG suprime fenotipos provocados por las repeticiones. Todos estos resultados supusieron un importante cambio en el estudio de la DM1, a partir del cual las proteínas Muscleblind (Mbl) se han considerado un elemento determinante en el desarrollo de la enfermedad.

A pesar de que la DM fue descrita por primera vez en 1909, todavía no se dispone de una terapia eficaz. Todos los tratamientos que se aplican son paliativos y ayudan a frenar el desarrollo de síntomas, pero en ningún caso evitan su aparición o tratan la enfermedad de forma definitiva. En la actualidad no existe ningún compuesto capaz de revertir la falta de la conductancia al cloro para reducir la miotonía. Algunos compuestos, como el mexilit, quinidina, fenitoína, procainamida o carbamazepina, que inhiben la entrada de sodio necesario para el inicio y propagación de impulsos, se administran a los pacientes con el fin de tratar este síntoma. En ocasiones, dichas moléculas se utilizan a su vez como tratamiento para las arritmias cardíacas, por lo que dado el riesgo que implican por su efecto sobre la función cardíaca es preferible evitar su uso como antimiotónicos. Además, muchos de estos tratamientos disminuyen la fuerza muscular. Otro inhibidor de canales de sodio, el sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS), se ha ensayado en pacientes en los que parece disminuir con éxito la miotonía y los problemas cardíacos, sin potenciar la debilidad muscular. El DHEAS es una hormona esteroidea presente de manera abundante en el suero y cuyos niveles disminuyen con la edad. En los pacientes de DM1, esta hormona está reducida hasta un 60%. Además, la dosis efectiva del DHEAS es muy alta, por lo que ha de administrarse por vía intravenosa, lo cual supone un inconveniente para su uso como tratamiento crónico. En algunos casos se administra creatinina junto con DHEAS para incrementar la fuerza muscular. Sin embargo, a pesar de que los primeros ensayos clínicos con creatinina en pacientes mostraron resultados prometedores, los estudios posteriores no son tan positivos. Otros fármacos ensayados para tratar la miotonía comprenden antidepresivos tricíclicos, benzodiazepinas, antagonistas del ión calcio, taurina o prednisona, con resultados contradictorios.

En base al anterior mecanismo de acción de la enfermedad que propone al secuestro y subsiguiente pérdida de función de las proteínas Muscleblind como el principal desencadenante de la enfermedad, se han desarrollado estrategias para encontrar moléculas que inhiban la interacción entre MBNL1 y las horquillas con repeticiones CUG. Así, se han identificado compuestos capaces de inhibir dicha interacción *in vitro*. Las moléculas de secuencia ((Quin/Pip)-(Asn/Pro)-Cys-Lys) fueron capaces de desplazar a MBNL1 en la unión a las repeticiones. Además, los antibióticos pentamidina y neomicina B, así como el bromuro de etidio y el naranja de tiazol, inhibieron la unión de MBNL1 a las repeticiones CUG. Además, la pentamidina revertía los defectos de splicing de los transcritos IR y TNNT2 en células HeLa en cultivo, y reducía en un 21% la formación de inclusiones nucleares que contenían MBNL1. En ratones modelo de DM1, la pentamidina también mejoró el splicing del Clcn-1 y Serca1, aunque de manera discreta y sin una respuesta a dosis clara. De este modo, la pentamidina es el primer ejemplo de molécula identificada *in vitro* con un efecto terapéutico potencial sobre las repeticiones CUG *in vivo*. No obstante, esta molécula podía afectar al procesado de otros transcritos diana de MBNL1 en ausencia de repeticiones, lo que podría contrarrestar su valor terapéutico a largo plazo. También se ha desarrollado en el estado de la técnica una molécula basada en la estructura tridimensional de las repeticiones CTG y/o CUG, cuya diana fuesen los desapareamientos T-T o U-U. A pesar de que ya se conocían moléculas pequeñas capaces de unirse a G-G, C-C o A-A, hasta la fecha no se había encontrado ningún compuesto que se uniese a T-T o U-U de manera selectiva. Así, se evidenció que el ligando formado por triaminotriazina (que interacciona con T-T y U-U) más acridina (agente intercalante) se unía a repeticiones CTG y CUG de manera específica y con alta afinidad respecto a otras secuencias.

## ES 2 365 967 A1

Además, en el estado de la técnica se divulga el diseño de un pentámero del compuesto Hoechst 33258 capaz de unirse a repeticiones CUG y CAG e inhibir la formación de complejos ARN-MBNL1 en ambos casos. Esta molécula era permeable y no tóxica al menos en mioblastos de ratón. También se desarrolló en paralelo un ligando con alta afinidad por moléculas de ARN con dos desapareamientos internos ricos en pirimidinas, como los formados por las repeticiones CCUG en la DM2. Este compuesto consistía en tres módulos de 6'-N-5-hexinoato de kanamicina A unidos a un esqueleto peptóide y separados entre sí por cuatro monómeros espaciadores. Reducir el número de espaciadores de cuatro a dos convertía a esta molécula en un ligando con mayor afinidad por repeticiones CUG que CCUG.

Estas estrategias o compuestos presentes en el estado de la técnica consiguen que MBNL1 se libere revirtiendo defectos de splicing. Además, al disiparse las inclusiones nucleares habría más transcritos DMPK libres en el citoplasma para traducirse. Sin embargo, la redistribución de los ARN mutantes podría tener un nuevo efecto tóxico. Aunque la formación de agregados de CUG y MBNL1 en el citoplasma de cardiomiocitos no causa defectos en ratones, otras proteínas podrían verse afectadas a corto o largo plazo. Además, las moléculas que interfieren con la unión entre MBNL1 y CUG podrían también inhibir la unión de MBNL1 a otros transcritos diana en el núcleo, tal como se ha encontrado para la pentamidina, o interferir con otras proteínas con un mecanismo de unión al ARN similar a MBNL1. Por último, cualquier aproximación terapéutica basada en MBNL1 presenta la limitación de que no toda la toxicidad de las repeticiones CUG se debe al secuestro de MBNL1.

La mayoría de enfermedades neuromusculares tienen su origen en mutaciones en un único gen y son, por tanto, buenas candidatas para el desarrollo de terapias génicas. Sin embargo, en el caso de la DM1 los tejidos involucrados son principalmente post-mitóticos, lo que supone un inconveniente frente a la mayoría de vectores virales. En este sentido, se ha propuesto que utilizar moléculas como los oligonucleótidos antisentido (ONAs) podría resultar ventajoso. Los oligonucleótidos antisentido no aportan una copia del gen, sino que modulan los productos de un gen existente. En la actualidad, varias moléculas basadas en esta estrategia se encuentran ya en fase clínica. Un ejemplo es el caso de la Distrofia Muscular de Duchenne (DMD, OMIM #300377), para la cual la empresa AVI Biopharma posee dos moléculas en fase preclínica en los Estados Unidos, una de las cuales está ya en fase clínica 1b/2 en el Reino Unido ([www.avibio.com](http://www.avibio.com)). En el estado de la técnica se conoce el uso de ONAs en ratones modelo que expresan 250 repeticiones CTG, así como en ratones knockout de MBNL1, y se ha estudiado su efecto sobre el splicing del exón 7a de los transcritos Cln-1. En ambos modelos una sola inyección en el músculo tibial anterior recuperó el patrón de splicing normal de los transcritos Cln-1 durante al menos tres semanas, revirtiendo la miotonía. Sin embargo, debido al amplio número de mensajeros cuyo procesamiento se encuentra alterado en los pacientes, deberían combinarse varios ONAs con dianas diferentes para tratar los distintos síntomas de una manera eficaz.

Una alternativa al uso combinado de ONAs es utilizar oligonucleótidos antisentido que actúen a nivel de los transcritos DMPK con el fin de eliminar la fuente de toxicidad. En el estado de la técnica ya se han realizado ensayos dirigidos a la inhibición de la expresión de DMPK en células de pacientes en cultivo utilizando ONAs específicos. Sin embargo, esta aproximación no discriminaba entre transcritos mutantes y transcritos salvajes. Disminuir la expresión total de DMPK podría resultar igualmente patológico dada la importancia de DMPK en la función cardíaca y el metabolismo de la insulina. Varios trabajos presentes en el estado de la técnica han utilizado ONAs formados por repeticiones CAG (CAG7 o CAG25) con el fin de dirigir su efecto preferentemente sobre los transcritos con repeticiones CUG largas. Tanto en mioblastos en cultivo como en ratones modelo de DM1, estos oligonucleótidos revirtieron los defectos de splicing del Cln-1, además de reducir hasta un 50% los niveles del transcrito mutante de manera específica, probablemente debido a que la unión de secuencias cortas de repeticiones CAG a los ARNs tóxicos promueve la formación de heteroduplex sin desemparejamientos, lo cual evita el secuestro de proteínas como MBNL1, para las cuales los desemparejamientos entre pirimidinas son elementos estructurales esenciales para la unión.

Así, las moléculas conocidas en el estado de la técnica tienen como mecanismo principal de actuación la inhibición del secuestro ejercido por las horquillas con repeticiones CUG sobre las proteínas MBNL, evitando la interacción entre las horquillas y las proteínas MBNL, sin ejercer un efecto directo en la desestructuración de las horquillas.

En cambio, la presente invención se focaliza en el rastreo de fármacos a partir de quimiotecas con el fin de identificar compuestos con actividad biológica relevante para tratar enfermedades cuya etiología se basa en la presencia de transcritos tóxicos que comprenden repeticiones CUG o CCUG como, por ejemplo: DM1, DM2 y SCA8. Los compuestos de la presente invención se basan en un mecanismo de acción más efectivo que los conocidos en el estado de la técnica ya que, según el mecanismo de acción más probable, se unen y desestructuran las horquillas de doble cadena formadas por los fragmentos tóxicos con repeticiones CUG, o mantiene el ARN con las expansiones en una conformación de cadena sencilla, evitando por tanto la unión aberrante de MBNL1 y de cualquier otra molécula cuya unión también pudiera causar o empeorar el fenotipo patológico. Además, al no competir con la unión aberrante de MBNL1 a horquillas CUG, las cuales son muy semejantes estructuralmente con las dianas naturales de la proteína, no se espera que interfiera con los transcritos regulados por MBNL1 en la célula. En la presente invención se empleó la mosca *Drosophila* como modelo de toxicidad de las repeticiones CTG (García-Lopez *et al.*, 2008), donde se ensayaron los compuestos de la invención y se determinó su mecanismo de acción sobre la toxicidad de repeticiones CTG. Posteriormente se validó su eficacia en modelos vertebrados de DM1.

## Descripción de la invención

En la presente invención se llevó a cabo un procedimiento para la identificación de compuestos con potencial terapéutico para prevenir o tratar enfermedades cuya etiología se basa en la presencia de transcritos tóxicos que comprenden repeticiones CUG o CCUG como, por ejemplo: DM1, DM2 y SCA8, que comprende el rastreo de quimiotecas de hexapéptidos *in vivo*, preferentemente en un modelo de la enfermedad en *Drosophila*, y la selección de aquellos compuestos que revierten el estado patológico.

El tamaño de las moléculas a utilizar para la búsqueda de agentes potencialmente terapéuticos es un aspecto importante a considerar, ya que un peso molecular demasiado alto limita la absorción del compuesto por parte de las células. La optimización de moléculas para dar lugar a compuestos más activos suele venir acompañada de un incremento en el tamaño final de los mismos. Sin embargo, un peso molecular mayor de 1000 reduce el potencial terapéutico de las moléculas al disminuir su biodisponibilidad, lo cual hace necesario partir de compuestos pequeños. De esta manera, el 80% de los fármacos comercializados en la actualidad tiene un peso molecular por debajo de 450. El peso molecular medio de un aminoácido es de unos 135 Da. El tamaño aproximado de un hexapéptido, por tanto, varía entorno a 810 Da. Rastrear librerías de péptidos formados por un número de aminoácidos mayor de 6 daría lugar a moléculas demasiado grandes. Por otro lado, a pesar de que existen colecciones de di, tri, tetra y pentapéptidos, el aumentar el número de aminoácidos que forman la molécula da lugar a una mayor cantidad de péptidos definidos durante la deconvolución, incrementando la probabilidad de encontrar un compuesto activo.

Se observó que el fenotipo exhibido por el modelo de *Drosophila* descrito en (García-Lopez *et al.*, 2008), que expresa 480 repeticiones CTG (CTG(480)) originando un fenotipo de letalidad en el estadio de pupa madura, responde a niveles de Mbl y es susceptible de modificación química, lo cual convierte a este modelo en adecuado para la búsqueda sistemática de compuestos con potencial terapéutico para prevenir o tratar enfermedades cuya etiología se basa en la presencia de transcritos tóxicos que comprenden repeticiones CUG o CCUG como, por ejemplo: DM1, DM2 y SCA8.

La presente invención comienza con el rastreo de una quimioteca combinatoria de péptidos en formato de rastreo posicional. Esta quimioteca estaba formada por 120 viales, cada uno de los cuales consistía en una mezcla de hexapéptidos que comparten un único aminoácido en una posición concreta y difieren en el resto. De esta manera, al detectar un vial positivo se identifica un aminoácido activo en una posición determinada. La combinación de los aminoácidos más activos en cada una de las posiciones ensayadas (viales) es lo que se conoce como deconvolución. En una realización preferida de la invención, con el objetivo de prolongar la vida media de los péptidos en el organismo, los péptidos de la quimioteca utilizada en la presente invención se compusieron de los estereoisómeros D de los aminoácidos naturales, los cuales no son reconocidos por las proteasas en el intestino y son menos susceptibles a degradación.

Así, la presente invención hace referencia a compuestos que comprenden hexapéptidos con contrastado potencial terapéutico *in vivo* en *Drosophila* y ratón para la prevención y/o tratamiento de enfermedades cuya etiología se basa en la presencia de transcritos tóxicos que comprenden repeticiones CUG o CCUG como, por ejemplo: DM1, DM2 y SCA8. El mecanismo de acción de los compuestos de la presente invención es más efectivo que el ejercido por los compuestos conocidos en el estado de la técnica ya que son capaces de unirse y desestructurar las horquillas de doble cadena formadas por los fragmentos tóxicos con dichas repeticiones, o mantener el ARN con las expansiones en una conformación de cadena sencilla, evitando tanto la unión aberrante o secuestro de MBNL, como de cualquier otra molécula cuya unión a horquillas CUG también pudiera causar o empeorar el fenotipo patológico.

Más específicamente, en la presente invención se ensayaron compuestos que comprenden péptidos de Fórmula (I) (A-B-C-D-E-F) o estereoisómeros, mezclas, sales farmacéuticamente aceptables o péptidos miméticos de los mismos. A continuación se definen los aminoácidos que pueden formar parte de cada una de las posiciones A a F de la Fórmula I, utilizando para nombrar a dichos aminoácidos tanto el código de tres letras como el código de una letra minúscula con la que por convención se suelen representar los estereoisómeros de los aminoácidos naturales:

- A puede ser los aminoácidos cys (c) ó pro (p),
- B puede ser los aminoácidos pro (p) ó gln (q),
- C es el aminoácido tyr (y),
- D puede ser los aminoácidos ala (a) ó thr (t),
- E puede ser los aminoácidos gln (q) ó trp (w); y
- F es el aminoácido glu (e).

En una realización preferida los aminoácidos que forman parte de los péptidos de la invención son D-aminoácidos, los cuales no son reconocidos por las proteasas en el intestino y son menos susceptibles a degradación. Sin embargo, tal y como se demuestra en los ejemplos, los péptidos formados por L-aminoácidos también son activos.

## ES 2 365 967 A1

En la presente invención se entiende por péptido mimético a una molécula orgánica de carácter peptídico caracterizada por una secuencia complementaria, homóloga y/o equivalente a la de los péptidos de la Fórmula (I). Los compuestos de la presente invención también comprenden secuencias complementarias, homólogas y/o equivalentes funcionales de los péptidos de Fórmula general I. En una realización preferida, los compuestos de la presente invención comprenden una secuencia homóloga la cual tiene al menos un 80% de identidad u homología con la secuencia del péptido de fórmula general I. Además, los compuestos de la presente invención pueden comprender péptidos que sean análogos químicos de los de la Fórmula I, péptidos cíclicos derivados, dímeros y/o multímeros.

Tal y como se evidencia en la presente invención, los compuestos que comprenden los péptidos arriba citados pueden ser usados en la prevención y/o tratamiento de enfermedades cuya etiología se basa en la presencia de transcritos tóxicos que comprenden repeticiones CUG o CCUG como, por ejemplo: DM1, DM2 y SCA8. Los hexapéptidos correspondientes a las secuencias SEQ ID NO: 1 a 16 fueron ensayados en el tratamiento de dichas enfermedades, siendo especialmente preferido el hexapéptido p10 (SEQ ID No: 10) que revirtió la toxicidad en el modelo de *Drosophila* arriba citado, tanto en cerebro, como en músculo, de manera dependiente de dosis en ambos casos. Además, la expresión endógena de un péptido de secuencia que comprende p10, en su configuración retroinversa, revirtió fenotipos en ojo y músculo de las moscas modelo confirmando el efecto de p10 y de derivados suyos sobre la toxicidad de las repeticiones CTG. Los resultados del rastreo de alaninas, así como de la generación de moscas transgénicas, demostraron que todos los aminoácidos de la secuencia de p10 son necesarios para su actividad y que ésta reside en las cadenas laterales de sus residuos. p10 se une a repeticiones CUG *in vitro* desplegando la horquilla. Esta unión depende de la secuencia del péptido y es mayor cuando el número de repeticiones aumenta. La inyección intramuscular de p10 en ratones modelo de la DM1 revirtió los defectos de *splicing* de los transcritos musculares, así como defectos a nivel histológico. Este efecto es sistémico y se mantuvo durante al menos 4 semanas tras una sola inyección.

Por lo tanto la presente invención se refiere en un primer aspecto a compuestos que comprenden los hexapéptidos de Fórmula I, o miméticos de los mismos, para ser usados en la prevención y/o tratamiento de enfermedades cuya etiología se basa en la presencia de transcritos tóxicos que comprenden repeticiones CUG o CCUG como, por ejemplo: DM1, DM2 y SCA8.

Un segundo aspecto de la presente invención hace referencia al uso de dichos compuestos para la elaboración de una composición farmacéutica destinada a la prevención y/o tratamiento de enfermedades cuya etiología se basa en la presencia de transcritos tóxicos que comprenden repeticiones CUG o CCUG como, por ejemplo: DM1, DM2 y SCA8.

Los compuestos descritos en la presente invención pueden utilizarse como principios activos en pacientes humanos o en animales pudiendo ser preparados en formulaciones y/o administrados, de acuerdo a los conocimientos existentes en el estado de la técnica del desarrollo galénico. Así, un tercer aspecto de la presente invención hace referencia a composiciones farmacéuticas que comprenden al menos uno de los péptidos de la invención en combinación con al menos otro principio activo. La composición también podría comprender al menos un excipiente como sustancia inactiva acompañante del principio activo que, por ejemplo, ayude a la absorción de dicho principio activo en el cuerpo o a su activación.

Dichos excipientes podrían estar destinados al mantenimiento de los ingredientes de la composición unidos como por ejemplo: almidones, azúcares o celulosas; rellenos como por ejemplo: celulosa vegetal, fosfato de calcio dibásico, flor de cártamo; desintegrantes; lubricantes, como por ejemplo: talco, sílica o grasas esteroideas; recubridores; edulcorantes; saborizantes; colorantes; etc.

Dicha composición puede ser administrada por cualquier vía de administración útil para hacer llegar al principio activo a su diana terapéutica, por ejemplo, por vía digestiva (oral, sublingual, gastroentérica o rectal), vía parenteral (subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intrarquídea, intraperitoneal, intradérmica o intraarticular), vía respiratoria o vía tópica.

Otro aspecto de la presente invención hace referencia a un método para la prevención y/o tratamiento de enfermedades cuya etiología se basa en la presencia de transcritos tóxicos que comprenden repeticiones CUG o CCUG como, por ejemplo: DM1, DM2 y SCA8, que comprende la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprenda al menos uno de los hexapéptidos de la invención. En la presente invención se entiende por "cantidad terapéuticamente eficaz" a aquella capaz de prevenir o tratar el estado patológico asociado a las enfermedades cuya etiología se basa en la presencia de transcritos tóxicos que comprenden repeticiones CUG o CCUG como, por ejemplo: DM1, DM2 y SCA8.

En la presente invención se observaron resultados positivos a concentraciones de p10 mayores de 40  $\mu\text{M}$  y menores de 250  $\mu\text{M}$ , preferentemente 70,4  $\mu\text{M}$ , en un modelo de DM1 en *Drosophila*.

**Descripción de las figuras**Figura 1. *Estrategia de rastreo posicional.*

- 5 (B) O1, O2 ... O6 representan posiciones definidas ocupadas por los 20 estereoisómeros D de los aminoácidos naturales posibles y las X hacen referencia a una mezcla equimolar de 19 de los 20 estereoisómeros D de los aminoácidos naturales (la cisteína se omite en las X, pero no en las posiciones definidas). Las 6 posiciones por los 20 aminoácidos posibles dan lugar a 120 combinaciones cada una de las cuales representa un vial en la quimioteca.
- 10 (A) Una vez identificados los viales positivos, se estudió qué aminoácido ocupa la posición definida en cada uno de ellos. La combinación de los aminoácidos positivos para dar lugar a péptidos de secuencia definida es lo que se conoce como deconvolución.

15 En el Ejemplo 1 puede encontrarse una explicación detallada acerca de las conclusiones obtenidas de la Figura 1, así como un análisis más profundo de la misma.

Figura 2. *Resultado del rastreo primario y deconvolución.*

- 20 (A) El rastreo de la quimioteca y su posterior análisis estadístico revelaron un total de 28 viales positivos ( $p$ -valor $<0.05$ ) cuyo código numérico se señala en el eje de abscisas de cada gráfica. De entre éstos, los 10 aminoácidos señalados (correspondientes a los viales con mayor actividad) se seleccionaron para llevar a cabo la deconvolución. O1XXXXX, XO2XXXX, XXO3XXX, XXXO4XX, XXXXO5X y XXXXXO6 representan viales con aminoácidos definidos para las posiciones 1, 2, 3, 4, 5 y 6, respectivamente.

- 25 (B) La deconvolución dio lugar a 12 hexapéptidos definidos.

30 Las gráficas muestran en el eje de ordenadas la inversa del  $p$ -valor obtenido en el rastreo primario como medida de actividad.

En el Ejemplo 1 puede encontrarse una explicación detallada acerca de las conclusiones obtenidas de la Figura 2, así como un análisis más profundo de la misma.

35 Figura 3. *Ensayo dosis-respuesta de p10 en un modelo de DM en Drosophila.*

- En el eje de ordenadas se representa el incremento de la supervivencia de los modelos de mosca y en el eje de abscisas se representa la concentración de p10 ( $\mu$ M). p10 suprimió el fenotipo de letalidad en moscas *103Y-Gal4/+;UAS-CTG(480)/+* de manera más eficaz entre 80 y 125  $\mu$ M. Esta tendencia se perdió al aumentar la concentración a 250  $\mu$ M. El valor Incremento de supervivencia corresponde a  $([\text{hembras nacidas tratadas}]-[\text{hembras nacidas control}]/n) \times 100$ .

40 En el Ejemplo 1 puede encontrarse una explicación detallada acerca de las conclusiones obtenidas de la Figura 3, así como un análisis más profundo de la misma.

Figura 4. *Estudio de la toxicidad de p10 en individuos silvestres.*

- 50 (A, B) Esta figura muestra el comportamiento dosis-respuesta frente al DMSO cuando éste es administrado en comida casera a embriones (A) o larvas L1 (B) de genotipo *OrR* (genotipo silvestre). En el eje de ordenadas se representa el número de adultos y en el eje de abscisas se representa el % de DMSO.

- 55 (C) Esta figura demuestra que p10 no es tóxico en individuos *OrR* ya que el número de larvas L1 que alcanza los estadios de pupa y adulto no difirieron respecto al control a ninguna concentración. Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado con 50 individuos por réplica (150 individuos en total para cada concentración). En el eje de ordenadas se representa el número de individuos y en el eje de abscisas se representa la concentración de p10 ( $\mu$ M). De cada grupo de tres columnas, la columna de la izquierda representa el número de larvas, la columna del medio el número de pupas y la columna de la derecha el número de adultos.

60 En el Ejemplo 2 puede encontrarse una explicación detallada acerca de las conclusiones obtenidas de la Figura 4, así como un análisis más profundo de la misma.

Figura 5. *Rastreo de Alaninas.*

- 65 Esta figura demuestra que la sustitución por alanina de cualquiera de los residuos del péptido p10 causa una pérdida de actividad. Los péptidos fueron administrados en la comida a larvas *103Y-Gal4/+;UAS-CTG(480)/+*. En el eje de ordenadas se representa el número de hembras y en el de abscisas los hexapéptidos de la invención ensayados: la

## ES 2 365 967 A1

columna de la izquierda corresponde con el control (0,1% DMSO) y las siguientes, de izquierda a derecha, con los péptidos p10 y los péptidos comprendiendo sustituciones de alanina con secuencias: ppyawa, ppyaae, ppaawe, payawe, apyawe. Las barras muestran valores promedio con su error estándar. \* indica p-valor<0.05.

5 En el Ejemplo 3 puede encontrarse una explicación detallada acerca de las conclusiones obtenidas de la Figura 24, así como un análisis más profundo de la misma.

Figura 6. *El péptido p10 suprime la toxicidad de CTG(480) en los músculos indirectos del vuelo (IFMs).*

10 La figura muestra de izquierda a derecha secciones transversales de 1.5  $\mu\text{m}$  de los IFMs de moscas normales (A), moscas que expresaban CTG(480) (B) y de moscas que expresaban CTG(480) bajo el control de Mhc-Gal4 tratadas oralmente con el péptido p10 (C). Las moscas tratadas con péptido tenían paquetes musculares de mayor tamaño que el control con DMSO. Las imágenes fueron tomadas a un aumento de 10x.

15 En el Ejemplo 4 puede encontrarse una explicación detallada acerca de las conclusiones obtenidas de la Figura 6, así como un análisis más profundo de la misma.

20 Figura 7. *Respuesta a dosis del péptido p10 en los IFMs.*

Secciones transversales de los IFMs de moscas *Mhc-Gal4/+;UAS-(CTG)480/+* tratadas con 0.12% DMSO (control) (A) y con el péptido p10 a distintas concentraciones: 62.5  $\mu\text{M}$  (B), 125  $\mu\text{M}$  (C), 250  $\mu\text{M}$  (D) y 500  $\mu\text{M}$  (E). En el eje de ordenadas de (F) se muestra el área muscular relativa ( $\mu\text{m}$ ). Además en (F) se muestran los resultados obtenidos siendo, de izquierda a derecha, la primera columna correspondiente a DMSO, y las siguientes correspondientes a concentraciones de p10 de: 62.5  $\mu\text{M}$ , 125  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  y 500  $\mu\text{M}$ . Entre 62.5  $\mu\text{M}$  y 250  $\mu\text{M}$  el péptido p10 causó un incremento significativo en el área muscular respecto a las moscas control (F), así como una disminución en la pérdida de fibras (cabeza de flecha en A). A 500  $\mu\text{M}$  el área de los IFMs fue menor que en las moscas control. Las barras en la gráfica muestran valores promedio con su error estándar. \* indica p-valor<0.05, \*\*\* indica p-valor <0.0001.

30 En el Ejemplo 4 puede encontrarse una explicación detallada acerca de las conclusiones obtenidas de la Figura 24, así como un análisis más profundo de la misma.

35 Figura 8. *Derivados del péptido p10 diseñados para su expresión endógena en Drosophila.*

En sentido descendente se muestra la secuencia de los péptidos de SEQ ID NO: 17-19 (p17-p19). Se muestra la Metionina inicial, las tres Glicinas espaciadoras y la secuencia del propio péptido p10 directa ( $\rightarrow$ ) o retroinversa ( $\leftarrow$ ).

40 En el Ejemplo 5 puede encontrarse una explicación detallada acerca de las conclusiones obtenidas de la Figura 8, así como un análisis más profundo de la misma.

Figura 9. *La expresión endógena de un péptido de L-aminoácidos que comprende a p10 mediante el sistema Gal4/UAS suprime la rugosidad causada por CTG(480) en el ojo.*

45 UAS-p18 y p-19 suprimieron la toxicidad de CTG(480) en ojo a 19°C y 21°C, dando lugar a un fenotipo menos rugoso y tamaño del ojo mayor que las moscas control (B, E vs C, F). Al aumentar la temperatura este fenómeno se invirtió y UAS-p-18 y p19 se convirtieron en potenciadores del efecto de las repeticiones (25°C; H vs I). UAS-p18 por sí solo no produjo ojo rugoso a 25°C (G). La figura (A) muestra un ojo silvestre. (D) La interacción de CTG(480) y *MBNLI* se utilizó como control positivo. Las imágenes (A-F) fueron tomadas bajo el microscopio electrónico de barrido. Las imágenes (G-I) se tomaron bajo la lupa.

55 En el Ejemplo 5 puede encontrarse una explicación detallada acerca de las conclusiones obtenidas de la Figura 9, así como un análisis más profundo de la misma.

Figura 10. *Cuantificación de la supresión de un fenotipo en ojo por co-expresión de (CTG)480 y distintas variantes de secuencia de p10.*

60 La cuantificación de la longitud del ojo en el eje dorso-ventral de moscas *GMR-Gal4 UAS-CTG(480)/UAS-p19* mostró un aumento significativo relativo al tamaño del ojo en las moscas control (*GMR-Gal4 UAS-CTG(480)/+*; p-valor<0.05, test t). Este efecto era mayor al aumentar la temperatura de 19°C a 21°C. En el eje de ordenadas se muestra el tamaño relativo del ojo respecto del control sin péptido y en el eje de abscisas, de izquierda a derecha, la columna control, la columna UAS-p19 a 19°C y UAS-p19 a 21°C.

65 En el Ejemplo 5 puede encontrarse una explicación detallada acerca de las conclusiones obtenidas de la Figura 10, así como un análisis más profundo de la misma.

## ES 2 365 967 A1

Figura 11. *Expresión endógena de un péptido de L-aminoácidos que comprende a p10 en los IFMs mediante el sistema Gal4/UAS.*

5 Secciones transversales de tórax (1.5  $\mu\text{m}$ ) de moscas que expresan CTG(480) (A) o CTG(480) y p18 simultáneamente (B) bajo el control del promotor *Mhc*. La presencia de p18 causó un aumento del tamaño de los músculos (C). La figura C muestra el área muscular en el eje de ordenadas y en el eje de abscisas representa el efecto de UAS-GFP, como control negativo, en la columna de la izquierda y el efecto de UAS-p18 en la columna de la derecha.

10 En el Ejemplo 5 puede encontrarse una explicación detallada acerca de las conclusiones obtenidas de la Figura 11, así como un análisis más profundo de la misma.

Figura 12. *Posibles mecanismos de acción del péptido p10 sobre la toxicidad de CTG(480).*

15 p10 podría afectar a la expresión de las repeticiones (A), desplazar a Mbl de las horquillas de ARN (B), desestabilizar las horquillas tóxicas (C) o actuar aguas abajo de las repeticiones (D). Sin embargo, tal y como se demuestra en las figuras y ejemplos sucesivos, el mecanismo de acción más probable de p10 se basa en la desestabilización de las horquillas tóxicas (C).

20 En el Ejemplo 6 puede encontrarse una explicación detallada acerca de las conclusiones obtenidas de la Figura 12, así como un análisis más profundo de la misma.

Figura 13. *Efecto de la expresión de p10 sobre la expresión de la proteína reportera luciferasa.*

25 El tratamiento con p10 no afecta de manera significativa a la expresión de luciferasa inducida por el sistema Gal4/UAS comparada con moscas expuestas a la misma cantidad de DMSO (0.12%). Sin embargo, el DMSO por sí sólo afectaba a la expresión del transgén. Las barras muestran valores promedio y su error estándar. \*\* indica p-valor < 0.01. En el eje de ordenadas se muestra la luciferasa (CPS) y en el eje de abscisas, de izquierda a derecha, los efectos de 0% de DMSO, 0,1% de DMSO y 250  $\mu\text{M}$  de p10.

30

En el Ejemplo 7 puede encontrarse una explicación detallada acerca de las conclusiones obtenidas de la Figura 13, así como un análisis más profundo de la misma.

35 Figura 14. *Efecto de p10 sobre la expresión de CTG(480).*

(A) Gel de agarosa que muestra los niveles de expresión de transcritos CUG(480) en moscas *Mhc-Gal4/+; UAS-CTG(480)/+* tratadas con 0.12% DMSO (control) (columna de la izquierda) o con p10 a distintas concentraciones (segunda columna: 62.5  $\mu\text{M}$ , tercera columna: 125  $\mu\text{M}$ , cuarta columna: 250  $\mu\text{M}$ , quinta columna 500  $\mu\text{M}$ ) amplificadas mediante RT-PCR semicuantitativa de una región del terminador *SV40*. Los transcritos del gen *Rp49* se utilizaron como control de carga del cDNA molde. La cuantificación de la intensidad de las bandas con el programa ImageJ no reveló cambios significativos en ningún caso ( $\alpha=0.05$ , test t).

40

(B). Las barras muestran promedios y su desviación típica de los resultados obtenidos en (A). DMSO (control) (columna de la izquierda) o p10 administrado a distintas concentraciones (segunda columna: 62.5  $\mu\text{M}$ , tercera columna: 125  $\mu\text{M}$ , cuarta columna: 250  $\mu\text{M}$ , quinta columna 500  $\mu\text{M}$ ).

45

En el Ejemplo 7 puede encontrarse una explicación detallada acerca de las conclusiones obtenidas de la Figura 14, así como un análisis más profundo de la misma.

50

Figura 15. *p10 alinea parcialmente con el primer dedo de zinc de Muscleblind.*

55 En sentido descendente se muestran las secuencias del primer dedo de zinc de Muscleblind correspondientes a *Drosophila melanogaster* (primera fila), *Caenorhabditis elegans* (segunda fila), *Gallus gallus* (tercera fila), *Danio Rerio* (cuarta fila) y *Homo Sapiens* (quinta, sexta y séptima fila: tres parálogos humanos). La secuencia reversa de p10 (última fila) alinea con una región crítica para la unión de la proteína al ARN. En negro se muestran aminoácidos conservados.

60

En el Ejemplo 8 puede encontrarse una explicación detallada acerca de las conclusiones obtenidas de la Figura 15, así como un análisis más profundo de la misma.

65

Figura 16. *Obtención de la proteína MblZF (dedos de zinc de Mbl) en E. coli.*

(A) Expresión de MblZF en la cepa BL21(DE3) de *E. coli*. A.I.: antes de la inducción con IPTG; S: sobrenadante del Usado de las células (fracción soluble); P: pellet del lisado de las células (fracción insoluble). La mayor parte de la proteína se encuentra en la fracción soluble (S), tal y como se señala en la flecha.

## ES 2 365 967 A1

(B) Ejemplo de purificación de la proteína MblZF en gradiente de imidazol por FPLC. Las fracciones 10 a 14 se sumaron para obtener un stock de proteína (C). Los asteriscos \*1 y \*2 muestran bandas secuenciadas por espectrometría de masas con el fin de confirmar la identidad de MblZF (\*1). La banda \*2 resultó ser la proteína 50S de *E. coli*, descartando que se tratase de un producto de degradación de MblZF.

5

En el Ejemplo 9 puede encontrarse una explicación detallada acerca de las conclusiones obtenidas de la Figura 16, así como un análisis más profundo de la misma.

10 Figura 17. *Espectro de DC (Dicroísmo Circular) de los dedos de zinc de las proteínas Muscleblind.*

(A) La proteína humana MBNL1 (2  $\mu$ M) presenta un pico pronunciado a 203 nm, y un pico débil a 220 nm, indicando que MBNL1ZF (primer par de dedos de zinc) no posee estructura secundaria a excepción de una pequeña porción en forma de hélice alfa (comparar con patrón en B). MblZF se comportó de manera similar, con un pico pronunciado a 205 nm y otro débil a 222 nm (C). (D) MblZF eluyó como un solo pico al pasar por una columna de exclusión molecular. El volumen de elución, comparado con un patrón de marcadores de peso molecular, coincide con el tamaño de MblZF en forma de monómero.

15

En el Ejemplo 9 puede encontrarse una explicación detallada acerca de las conclusiones obtenidas de la Figura 17, así como un análisis más profundo de la misma.

20

Figura 18. *Esquema de un ensayo de polarización de fluorescencia.*

25 Los ensayos de polarización de fluorescencia consisten en marcar una molécula pequeña con un fluoróforo (repeticiones CUG conjugadas con carboxifluoresceína en el caso de la presente invención; A), de forma que cuando ésta se une a una molécula de peso molecular mayor (como la proteína MblZF) se modifique su velocidad de rotación (B). Los cambios en la velocidad de rotación se pueden detectar excitando la molécula con haces de luz polarizada en los planos vertical y horizontal y midiendo la dirección de polarización de la fluorescencia emitida. Si una molécula de pequeño tamaño (p10) fuese capaz de inhibir la unión entre MblZF y FAM-CUG23 (23 repeticiones de CUG conjugadas con fluoróforo carboxifluoresceína), el ARN fluorescente incrementaría de nuevo su velocidad de rotación, reduciendo su polarización (C).

30

En el Ejemplo 10 puede encontrarse una explicación detallada acerca de las conclusiones obtenidas de la Figura 18, así como un análisis más profundo de la misma.

35

Figura 19. *MblZF y p10 se unen a repeticiones CUG.*

40 MblZF causó un incremento en la polarización de FAM-CUG23 provocado por la unión entre ambas moléculas. Esta unión es reversible si se compete con un ARN CUG23 no marcado (A) y es proporcional a la cantidad de MblZF (B). p10 también causa un incremento de la polarización de FAM-CUG23 (C). Este incremento es discreto debido al reducido tamaño del péptido y no cambia de manera considerable al aumentar su concentración (D). p10 no revierte el efecto de MblZF sobre FAM-(CUG)23. \* indica p-valor<0.05 (test t). En el eje de ordenadas de las figuras A y C se muestra la polarización relativa y en el eje de ordenadas de las figuras B y D se muestra el incremento de polarización.

45

En el Ejemplo 10 puede encontrarse una explicación detallada acerca de las conclusiones obtenidas de la Figura 19, así como un análisis más profundo de la misma.

50

Figura 20. *Estudio de la unión de MblZF a FAM-(CUG)23 mediante ensayos de retardo en gel.*

55 MblZF se une a FAM-CUG23 causando la retención del complejo en el pocillo. Esto ocurre a todas las concentraciones de ARN ensayadas para una concentración de proteína fija (A). La unión entre FAM-(CUG)23 y MblZF es específica ya que se puede competir con un ARN CUG23 no marcado (proporción FAM-(CUG)23:CUG23 1:100; Fig B, carrera 3), y no ocurre si la proteína se desnatura por calor antes de incubarse con FAM-(CUG)23 (Figura B, carrera 4). La proteína colágeno alfa-3 utilizada a la misma concentración que MblZF no se une al ARN (Figura B, carrera 5) (\*1: MblZF desnaturada por calor, \*2: incubado con colágeno alfa 3). MblZF también se une a ARNs de menor tamaño (FAM-(CUG)4) formando complejos que quedan retenidos en el pocillo del gel (C).

60

En el Ejemplo 10 puede encontrarse una explicación detallada acerca de las conclusiones obtenidas de la Figura 20, así como un análisis más profundo de la misma.

65

## ES 2 365 967 A1

Figura 21. *La cola de Histidinas de MblZF no afecta a su unión a FAM-(CUG)23.*

(A) Gel que muestra la digestión con la proteasa TEV para eliminar las 6 Histidinas de la proteína MblZF. El producto de la digestión (MblZF<sup>ΔHis</sup>) se pasó por una columna de afinidad de Níquel para retener las Histidinas y eliminar TEV, al eluir ésta de manera diferente a MblZF<sup>ΔHis</sup> (B). (C) Resultado tras la purificación. (D) MblZF<sup>ΔHis</sup> se une a FAM-(CUG)23 y esta unión es proporcional a la concentración de proteína.

En el Ejemplo 10 puede encontrarse una explicación detallada acerca de las conclusiones obtenidas de la Figura 21, así como un análisis más profundo de la misma.

10

Figura 22. *El complejo MblZF/FAM-(CUG)23 no migra hacia el polo positivo.*

(A) En las condiciones de electroforesis utilizadas, la proteína MblZF apenas entraba en el gel (tinción de plata, Figura A izquierda). Si se corre tanto la proteína como el complejo ARN-proteína en un gel horizontal con los pocillos colocados en el centro sólo se observaba proteína migrando hacia el polo negativo. Si se sube el pH del tampón de electroforesis un punto por encima del pI de MblZF la proteína seguía migrando hacia el polo negativo (B). La proteína MblZF<sup>ΔHis</sup> tampoco entraba en el gel (B). Fijar el complejo ARN-proteína por entrecruzamiento con FA y resolverlo en un gel desnaturalizante (en el que el SDS confiere carga negativa a la proteína) no cambió el comportamiento de MblZF (C).

20

En el Ejemplo 10 puede encontrarse una explicación detallada acerca de las conclusiones obtenidas de la Figura 22, así como un análisis más profundo de la misma.

Figura 23. *p10 se une a repeticiones CUG sin desplazar a MblZF.*

(A) p10 (1 mM) puede unirse al ARN FAM-(CUG)23 (60 nM). (B) Esta unión es proporcional a la cantidad de péptido y se detecta a partir de ~500 μM. p10 (1 mM) se une con menor afinidad a repeticiones de tamaño corto (FAM-(CUG)4, 60 nM) (C). La unión del péptido a FAM-(CUG)23 no interfiere con la interacción de la proteína MblZF (D), al menos de forma significativa en este ensayo.

30

En el Ejemplo 10 puede encontrarse una explicación detallada acerca de las conclusiones obtenidas de la Figura 23, así como un análisis más profundo de la misma.

35

Figura 24. *Especificidad del péptido p10.*

(A) Ninguno de los cinco péptidos del rastreo de alaninas (el primer tubo de la izquierda es el control y los cinco siguientes corresponden a los péptidos: ppyawa, ppyaae, ppaawe, payawe y apyawe) (2.5 mM) se unió al ARN FAM-(CUG)23 (60 nM) de manera significativa, demostrando que la interacción descrita para p10 es específica. (B) p10 (1 mM) puede unirse tanto a ARN como ADN de doble cadena (de) y cadena sencilla (es) (60 nM). (C) Esquema que muestra la estructura secundaria de los ácidos nucleicos empleados en el experimento mostrado en (B).+

40

En el Ejemplo 11 puede encontrarse una explicación detallada acerca de las conclusiones obtenidas de la Figura 24, así como un análisis más profundo de la misma.

45

Figura 25. *p10 se une con mayor afinidad a DMPK-CUG4.*

(A) Experimento de extinción de la fluorescencia del triptófano de p10 (5 μM). El péptido se incubó con distintos ácidos nucleicos (2.5 μM, 5 μM, 7.5 μM, 10 μM y 12.5 μM). La tasa de extinción de fluorescencia (en el eje de ordenadas se representa la fluorescencia relativa) se midió como la pendiente de las rectas obtenidas al representar los valores de emisión de fluorescencia a 351 nm relativos al péptido libre para cada punto de concentración. Se realizaron al menos dos medidas por punto. En todos los casos dicha tasa era mayor para DMPK-CUG4, aunque no de manera significativa para CAG CUG4 (B).

55

En el Ejemplo 11 puede encontrarse una explicación detallada acerca de las conclusiones obtenidas de la Figura 25, así como un análisis más profundo de la misma.

60

Figura 26. *p10 disminuye el empaquetamiento de las repeticiones CUG.*

Tanto MblZF (A, 1 μM y 1.5 μM) como p10 (B, 0.1 μM, 0.5 μM, 1 μM, 10 μM y 20 μM) cambiaron el espectro de dicroísmo circular (DC) de CUG(60) (1 μM), reduciendo el pico de emisión del ARN a ~265 nm de manera proporcional a la concentración de proteína o péptido. Sin embargo, este efecto no se revirtió cuando se incubó el ARN con MblZF y p10 conjuntamente, independientemente del orden de adición (C). Este cambio no se debía a degradación del ARN durante el tiempo que duró el experimento (D) y tampoco ocurría cuando CUG60 se incubaba con los hexapéptidos del rastreo de alaninas de secuencias ppyawa (E, 0.5 μM y 1 μM) y payawe (F, 1 μM).

65

## ES 2 365 967 A1

En el Ejemplo 12 puede encontrarse una explicación detallada acerca de las conclusiones obtenidas de la Figura 24, así como un análisis más profundo de la misma.

5 Figura 27. *p10 abre las horquillas de repeticiones CUG.*

Medidas de la fluorescencia emitida (eje de ordenadas), medida como unidades relativas de fluorescencia (URF), por la 2-amino purina en un ARN (CUG)<sub>23</sub> (1  $\mu$ M) en presencia de MblZF (0.1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, y 5  $\mu$ M) (A) o p10 (0.1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M y 100  $\mu$ M) (B) relativa a la fluorescencia emitida por el ARN libre. p10 causó un incremento de 2.9 en la fluorescencia de 2-AP, indicando un cambio hacia cadena sencilla. Este efecto no se observó al incubar el ARN con DMSO, o con los péptidos del rastreo de alaninas con secuencias: ppyawa y payawe (C).

En el Ejemplo 12 puede encontrarse una explicación detallada acerca de las conclusiones obtenidas de la Figura 27, así como un análisis más profundo de la misma.

15

Figura 28. *Ejemplo de análisis histopatológico.*

La inyección intramuscular de 0.2% DMSO (A) ó 0.5  $\mu$ g de p10 (B) en ratones *FVB* generó una zona pequeña mixedematosa sin apenas reacción inflamatoria relevante asociada en ambos casos.

En el Ejemplo 13 puede encontrarse una explicación detallada acerca de las conclusiones obtenidas de la Figura 28, así como un análisis más profundo de la misma.

25

Figura 29. *p10 revierte defectos de splicing de Serca1 y Tnnt3 en ratones modelo de DM1.*

La inyección intramuscular de 2% DMSO (-) o 10  $\mu$ g p10 (+) aumentó el porcentaje de inclusión del exón 22 de los transcritos de *Serca1* 2 y 4 semanas después d/i (B, C y D) y de exclusión del exón fetal F de *Tnnt3* 1, 2 y 4 semanas después de la inyección (d/i; A, B y C). El péptido p10 no alteró el procesado de estos transcritos en ratones *FVB* ni *HSA<sup>SR</sup>*, y tampoco afectó los transcritos control *Capzb* (A-C). Las figuras (A-C) muestran resultados de RT-PCR llevadas a cabo durante 25 ciclos. Las líneas horizontales unen la extremidad izquierda (inyectada con suero con 2% DMSO) y derecha (inyectada con 10  $\mu$ g péptido) del mismo animal, en ese orden. Las barras en (D) corresponden a valores promedio con su error estándar. Los p-valores se hallaron utilizando un test t.

35

En el Ejemplo 14 puede encontrarse una explicación detallada acerca de las conclusiones obtenidas de la Figura 29, así como un análisis más profundo de la misma.

40 Figura 30. *Efecto sistémico de p10 sobre el splicing alternativo de Serca1.*

El porcentaje de inclusión del exón 22 (eje de ordenadas) en ratones *FVB* y *HSA<sup>SR</sup>* 4 semanas después de la inyección de 10  $\mu$ g de p10 era del 100%. Este valor era del 16.8%  $\pm$  10.5 en los animales *HSA<sup>LR</sup>* inyectados con 2% DMSO en ambas patas. En los animales *HSA<sup>LR</sup>* tratados el porcentaje de inclusión resultó del 55.1%  $\pm$  4.9 en la pata inyectada con p10 y del 31.5%  $\pm$  9.8 en la pata izquierda del mismo animal (inyectada con suero con 2% DMSO).

En el Ejemplo 14 puede encontrarse una explicación detallada acerca de las conclusiones obtenidas de la Figura 30, así como un análisis más profundo de la misma.

50

Figura 31. *p10 disminuye el número de células musculares con núcleo central.*

Crio secciones del músculo tibial anterior teñidas con hematoxilina eosina mostrando la presencia de núcleos centrales en los animales *HSA<sup>LR</sup>* (A), mientras que éstos se disponen en la periferia de las células en los animales *FVB* (C). p10 redujo el porcentaje de fibras con núcleos centrales en los ratones *HSA<sup>LR</sup>* de manera significativa transcurridas 4 semanas tras la inyección tanto de 0.5  $\mu$ g como de 10  $\mu$ g (B y D). (1) Indica animales cuyo control se inyectó con 0.2% de DMSO. (2) Indica animales cuyo control se inyectó con 2% de DMSO.

En el Ejemplo 15 puede encontrarse una explicación detallada acerca de las conclusiones obtenidas de la Figura 31, así como un análisis más profundo de la misma.

A continuación se muestran los ejemplos llevados a cabo en la presente invención para ilustrar los resultados conseguidos, sin pretender limitar el alcance de la invención.

65

**Ejemplos**

## Ejemplo 1

5 *Rastreo de una quimioteca combinatoria de hexapéptidos*

Cada vial de la quimioteca está formado por una mezcla de 2.5 millones de péptidos que comparten un único aminoácido en una posición definida y difieren en el resto (Figura 1A). Así, la combinación de las 6 posiciones definidas por los 20 aminoácidos posibles para ocuparlas da lugar a los 120 viales que componen la quimioteca, sumando un total de 50 millones de secuencias distintas. El principio en el que se basa el uso de quimiotecas combinatorias en formato de rastreo posicional es que cada una de las posiciones de la molécula se ensaya independientemente de las demás, de forma que sea posible definir cuál es el mejor aminoácido candidato para cada una de las seis posiciones del hexapéptido. Así, a partir de la lectura de los resultados del rastreo se obtuvieron los aminoácidos más activos para cada posición. Basándose en combinaciones de éstos, se sintetizaron a continuación péptidos de secuencia definida (lo que se conoce como deconvolución) (Figura 1B) y estas moléculas se ensayaron de nuevo.

Los 120 viales que constituyen la quimioteca se ensayaron de manera individual sobre el fenotipo de letalidad en pupa por expresión de 480 CTG bajo el control de 103Y-Gal4 a una concentración de 80  $\mu$ M. El análisis estadístico de los resultados reveló un total de 28 viales positivos ( $p < 0.05$ ; 23.3% del total), cada uno de los cuales representa un aminoácido activo en una posición concreta. Así, para las posiciones O1, O2, O3, O4, O5 y O6 del hexapéptido se obtuvieron un total de seis, tres, seis, cuatro, dos y siete aminoácidos activos respectivamente (Figura 2A). Para llevar a cabo la deconvolución, se seleccionaron 10 de estos 28 aminoácidos, atendiendo a su grado de actividad en el ensayo biológico (Figura 2A). Finalmente, de las combinaciones posibles se seleccionaron 16 secuencias para llevar a cabo la síntesis de los hexapéptidos definidos (Figura 2B). La selección de estos 16 péptidos atendió a criterios de redundancia entre las propiedades físicas y químicas de aminoácidos activos en posiciones similares.

Los 16 hexapéptidos definidos fueron ensayados a la mayor concentración posible en función del porcentaje de DMSO en el que se encontrasen disueltos. p10 mostró un aumento significativo en el número de hembras nacidas respecto al control con DMSO a una concentración de 80  $\mu$ M. La Tabla 1 indica la actividad de los péptidos de la invención. \* indica  $p$ -valor  $< 0.05$ . - indica que no nacieron hembras, tanto en los tubos control como en los tratados.

TABLA 1

Actividad de los péptidos definidos obtenidos tras la deconvolución		
Nomenclatura/ Secuencia	Concentración	Nacidas tratadas/Nacidas control
p1 / SEQ ID NO: 1	80 $\mu$ M	0,3
p2 / SEQ ID NO: 2	80 $\mu$ M	-
p3 / SEQ ID NO: 3	80 $\mu$ M	0,8
p4 / SEQ ID NO: 4	62 $\mu$ M	-
p5 / SEQ ID NO: 5	25 $\mu$ M	2,0
p6 / SEQ ID NO: 6	25 $\mu$ M	-
p7 / SEQ ID NO: 7	80 $\mu$ M	1,4
p8 / SEQ ID NO: 8	57 $\mu$ M	0,9
p9 / SEQ ID NO: 9	80 $\mu$ M	2,0
p10 / SEQ ID NO: 10	80 $\mu$ M	4,0*
p11 / SEQ ID NO: 11	80 $\mu$ M	0,8
p12 / SEQ ID NO: 12	80 $\mu$ M	3,0
p13 / SEQ ID NO: 13	80 $\mu$ M	0,8
p14 / SEQ ID NO: 14	40 $\mu$ M	1,8
p15 / SEQ ID NO: 15	40 $\mu$ M	0,5
p16 / SEQ ID NO: 16	38.5 $\mu$ M	0,4

## ES 2 365 967 A1

Con el fin de confirmar el efecto de p10, éste fue sometido a ensayos de dosis-respuesta a las siguientes concentraciones: 20  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$ , 125  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  (Figura 3). p10 no mostró actividad a 20  $\mu\text{M}$  y 40  $\mu\text{M}$ , mientras que ésta aumentó a 80  $\mu\text{M}$  (dando lugar a un número de hembras 1.43 veces mayor que el control) y 125  $\mu\text{M}$  (con un número de hembras 1.47 veces mayor que el control). El análisis de los datos mediante un test no lineal reveló que la dosis efectiva 50 (DE50) de p10 es 70.4  $\mu\text{M}$  para este fenotipo. A 250  $\mu\text{M}$  la actividad del péptido disminuyó, posiblemente debido a un efecto tóxico del péptido a concentraciones más altas.

### Ejemplo 2

#### *Estudio de la toxicidad de p10*

Con el fin de analizar la toxicidad de p10 se estudió su efecto sobre moscas de genotipo salvaje (*OrR*) en medio nutritivo casero. Al desconocerse el valor máximo de DMSO tolerable por las moscas en esta comida, se realizó un primer experimento sometiendo a los individuos a concentraciones crecientes del disolvente, bien desde estadios embrionarios o desde fase de larva L1. La tolerancia al DMSO en comida casera resultó ser de un orden de 3-4 veces mayor que la determinada para el medio nutritivo instantáneo del proveedor Sigma (0.3-0.4% vs 0.1%, Figura 4). Los resultados de supervivencia obtenidos para los individuos tratados con DMSO desde el embrión mostraron una variabilidad muy alta (Figura 4A), probablemente debido a la presencia de huevos sin fecundar entre los embriones seleccionados. Los individuos tratados desde estadio larvario mostraron un comportamiento mucho más homogéneo (Figura 4B). Por tanto, se decidió alimentar a larvas L1 con concentraciones crecientes de p10 y se contó el número de individuos que llegaban a fase de pupa y adulto. p10 no resultó tóxico en ninguno de los estadios a ninguna de las concentraciones ensayadas (67.5  $\mu\text{M}$ , 125  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  y 1 mM; n: 150 en cada caso; Figura 4C), pudiendo por tanto existir un efecto tóxico dependiente de genotipo en el caso mostrado en la Figura 3.

### Ejemplo 3

#### *Estudio de la relevancia de cada aminoácido en la secuencia peptídica*

Con el fin de determinar la contribución de cada uno de los residuos de p10 a su actividad sobre CTG(480), se realizó un experimento de rastreo de alaninas. Estos experimentos se basan en sustituir cada uno de los aminoácidos del péptido por alanina manteniendo los demás. La alanina es un aminoácido pequeño y en general poco activo, razón por la cual es utilizado para este tipo de estudios. Ya que cada sustitución por alanina examina la contribución de un aminoácido individual, este experimento permite, por un lado, evaluar si p10 es susceptible de optimización (en caso de que una sustitución aumente la eficacia de la molécula), o determinar qué aminoácidos son importantes para su función (en caso de que una sustitución disminuya su actividad). La secuencia de p10 permite 5 sustituciones, por lo que se sintetizaron 5 hexapéptidos nuevos que fueron ensayados sobre el fenotipo de letalidad en moscas *103Y-Gal4; UAS-CTG(480)/+* y comida comercial. Todos ellos mostraron una actividad menor que la molécula original, indicando que todos los aminoácidos de la secuencia de p10 son necesarios para la actividad final del péptido en este ensayo funcional (Figura 5).

### Ejemplo 4

#### *Validación de la actividad de p10 en otros tejidos. p10 mejora defectos histológicos causados por CTG(480) en los músculos indirectos del vuelo*

Puesto que los principales síntomas característicos de la DMI afectan al músculo, se decidió estudiar el efecto de p10 sobre este tejido en las moscas modelo. La expresión de CTG(480) bajo el control del promotor de la cadena pesada de la Miosina (línea *Mhc-Gal4*) provoca defectos a nivel histológico en los músculos indirectos del vuelo (IFM, del inglés *indirect flight muscles*), los cuales incluyen pérdida de fibras musculares y degeneración progresiva. Estos defectos afectan a su función, impidiendo a las moscas volar. El péptido p10 se ensayó sobre el fenotipo de falta de vuelo utilizando el método de *caída en cilindro* desarrollado por Benzer (Benzer, 1973) y en medio nutritivo casero. No se observaron cambios en la capacidad de vuelo de las moscas (concentraciones ensayadas: 62.5  $\mu\text{M}$  y 125  $\mu\text{M}$ ; n: 117 y 77 respectivamente) respecto al control con DMSO (n: 55). No obstante, el análisis al microscopio de secciones transversales de tórax de moscas modelo de 3-4 días de edad reveló una mejora de los músculos a nivel histológico (Figura 6). Puesto que la capacidad de vuelo de las moscas es muy sensible a cambios estructurales y metabólicos en los sarcómeros de los IFMs, es posible que ésta fuese la causa de que la mejora histológica observada no diese lugar a una mejora funcional.

Para confirmar esta observación, así como cuantificar el efecto observado, se sometió a p10 a un ensayo de dosis-respuesta a las siguientes concentraciones: 62.5  $\mu\text{M}$ , 125  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  y 500  $\mu\text{M}$ , y se realizaron cortes histológicos semifinos en moscas de 10 días de edad (Figura 7A-E). La cuantificación del área muscular en las moscas tratadas reveló una mejora significativa dependiente de dosis (Figura 7F). Estos resultados también demostraron que el efecto de p10 es independiente de factores específicos de tejido, ya que p10 es activo tanto en el cerebro como en el músculo. A 500  $\mu\text{M}$ , sin embargo, los músculos mostraban un tamaño reducido y la viabilidad de las moscas disminuyó.

## Ejemplo 5

*La expresión endógena de un péptido de L-aminoácidos que comprende a p10 suprime fenotipos provocados por repeticiones CTG*

5

La administración de p10 suprimió al menos parte de los fenotipos provocados por CTG(480). Ya que en la experimentación llevada a cabo inicialmente en la presente invención p10 se añade a la comida, no se podía saber cuántas moléculas llegaban finalmente a las células. Con el fin de poder controlar de manera precisa la administración de p10 y asegurar la presencia del péptido en los mismos tejidos y en el mismo momento que los transcritos CUG(480), se generaron moscas transgénicas capaces de expresar p10 de manera endógena y controlada utilizando el sistema Gal4/UAS.

10

Así se diseñaron tres transgenes diferentes con SEQ ID NO: 17-19 (p17-p19) que codificaban distintos péptidos basados todos ellos en la secuencia SEQ ID NO: 10 correspondiente a p10 (Figura 8), teniendo en cuenta el sesgo en el uso de codones en *Drosophila* (es decir favoreciendo el uso de G y, sobre todo, de C en los sitios sinónimos; Powell & Moriyama, 1997) y añadiendo a la secuencia SEQ ID NO: 10 una Metionina inicial, así como tres Glicinas espaciadoras. Además, aguas arriba del codón de inicio ATG se añadieron 21 nucleótidos del extremo 5'UTR del gen *act5C* de *Drosophila* que incluían la secuencia Kozak, con el fin de potenciar la expresión de los transgenes.

15

p17 contenía la secuencia directa del péptido de SEQ ID NO: 10. Como se ha comentado, los péptidos de la quimioteca de hexapéptidos están formados por D-aminoácidos. Las formas D (dextrógiras) de los aminoácidos son estereoisómeros de las formas L (levógiras) y sólo los L-aminoácidos se sintetizan en las células y se incorporan a las proteínas. Por lo tanto, si la disposición de las cadenas laterales de p10 era importante para su función, ésta se perdería al ser p17 sintetizado a partir de L-aa por *Drosophila*. Por esta razón, se decidió generar la construcción p18, en la cual se invirtió la secuencia del péptido de SEQ ID NO: 10, dando lugar así a un péptido retroinverso (Chorev & Goodman, 1995; P. M. Fischer, 2003). En el momento en que estos transgenes fueron generados, las construcciones más pequeñas descritas en la literatura codificaban péptidos de más de 20 aminoácidos, lo que suponía más del doble del tamaño del los péptidos p17 y p18 (de tan sólo diez aminoácidos). Por esta razón, se generó la construcción p19, la cual combinaba las construcciones del péptido p17 y p18, dando lugar a un péptido de 19 aminoácidos. Las tres construcciones fueron microinyectadas en los precursores de la línea germinal de embriones de *Drosophila* dando lugar a 10 líneas de moscas transgénicas para cada transgén.

20

25

Las moscas transgénicas obtenidas se cruzaron con las líneas de moscas recombinantes *GMR-Gal4 UAS-CTG(480)/CyO* y *Mhc-Gal4 UAS-CTG(480)/TM6b* generadas durante esta invención, las cuales dirigían la expresión de las repeticiones CTG en ojo y músculo, respectivamente. Al igual que las moscas *sev-Gal4 UAS-CTG(480)/+*, los adultos *GMR-Gal4 UAS-CTG(480)/UAS-GFP* presentaban un fuerte fenotipo de ojo rugoso. La coexpresión de CTG (480) y p18 ó p19 (pero no p17) a 19°C y 21°C dio lugar a moscas con ojos visiblemente menos rugosos que los individuos control (Figura 10; Figura 9B-C y E-F). Estos resultados confirman que péptidos de L-aminoácidos que contienen la secuencia de p10 en su disposición retroinversa son capaces de suprimir fenotipos desencadenados por las repeticiones e indican que los péptidos p18 y p19 se traducían y eran activos a pesar de su corto tamaño, ya que su expresión modificaba la toxicidad de CTG(480). No obstante, el fenómeno contrario ocurría a 25°C y a 29°C. A 25°C la expresión endógena de p18 o p19 potenciaba la toxicidad de las repeticiones CTG dando lugar a un ojo de menor tamaño, con pérdida de pigmentación y dramática fusión de omatidios (Figura 9H-I). A 29°C el cruce entre moscas *GMR-Gal4 UAS-CTG(480)/CyO* y *UAS-p18* o *UAS-p19* no produjo descendencia sin el balanceador CyO, indicando que p10 reducía la viabilidad de los individuos *GMR-Gal4 UAS-CTG(480)* a dicha temperatura. Cabe destacar que la expresión de p 18 y p19 por sí sola a 25°C y 29°C no causó ningún fenotipo (Figura 9G). Debido a que los cambios de temperatura afectan de manera diferente a la expresión de los transgenes CTG(480) y péptidos p17-p19 al estar éstos insertados en regiones distintas del genoma, es posible que exista una relación entre la cantidad de péptido y repeticiones que sea necesario alcanzar, superada la cual p10 se volvía tóxico.

30

35

40

De manera importante, todas las líneas portadoras del transgén p18 (*UAS-p18*) ensayadas (es decir, 5) y una de las tres las líneas portadoras del transgén p19 (*UAS-p19*) modificaron el fenotipo de las moscas *GMR-Gal4 UAS-CTG(480)*, mientras que ninguna de las cinco líneas ensayadas de la construcción p17 (*UAS-p17*) lo hacía. Esto indica que la orientación de las cadenas laterales de los aminoácidos de p10 juega un papel esencial en su actividad.

45

La coexpresión de CTG(480) y p18 o p19 con la línea *Mhc-Gal4* a 25°C también suprimió los defectos histológicos de los IFMs en adultos recién eclosionados, aumentando el tamaño de los paquetes musculares (Figura 11). Esto confirma el efecto de p10 sobre CTG(480). De nuevo, tan sólo líneas portadoras de los transgenes p18 y p19 modificaron el fenotipo.

50

## Ejemplo 6

*Estudio del mecanismo de acción de p10*

55

Los resultados obtenidos *in vivo* demostraron un efecto de p10 sobre la toxicidad de las repeticiones CTG. Además la Figura 12 muestra varias hipótesis que resumen cómo p10 podría ejercer su efecto en las células. En primer lugar, p10 podría afectar a los niveles de transcritos CUG(480), bien interfiriendo con el sistema Gal4/UAS o disminuyendo

60

## ES 2 365 967 A1

la estabilidad de los ARNs tóxicos (Figura 12A). Por otro lado, p10 podría unirse a las repeticiones CUG liberando factores nucleares secuestrados por éstas, como Mbl. De esta manera dichas proteínas podrían desempeñar de nuevo sus funciones normales (Figura 12B). p10 podría también unirse a las repeticiones CUG impidiendo que éstas se plieguen formando horquillas tóxicas de doble cadena (Figura 12C). Por último, p10 podría estar actuando sobre otras proteínas o transcritos aguas abajo de las alteraciones provocadas por las repeticiones inhibiendo, por ejemplo, antagonistas de Mbl y con ello compensando la falta de función de estas proteínas (Figura 12D).

Con el fin de estudiar cada una de las hipótesis propuestas, se decidió llevar a cabo una serie de experimentos a nivel molecular e *in vitro*, los cuales se detallan a continuación.

### Ejemplo 7

#### *p10 no afecta a los niveles de expresión de CTG(480)*

Para estudiar si p10 afectaba a la expresión de CTG(480) se utilizaron dos estrategias diferentes. En primer lugar, se alimentaron moscas *Mhc-Gal4/+ ; UAS-luciferasa/+* con el péptido a 250  $\mu\text{M}$  en medio nutritivo casero. p10 produjo una leve disminución en los niveles de emisión de luz. Sin embargo, esta diferencia no era significativa respecto al control con DMSO ( $\alpha=0.05$ , test t; Figura 13), demostrando que el péptido no afectaba al sistema Gal4/UAS de forma inespecífica. Sin embargo, la presencia por sí sola de DMSO en la comida de las moscas control causó un incremento en los niveles de proteína luciferasa. Estos resultados indican que el disolvente podría afectar a la expresión de este transgén, posiblemente por un efecto descrito como supresor de la variegación dependiente de posición.

En segundo lugar, se determinó si p10 afectaba específicamente a los niveles de transcritos CUG(480) mediante RT-PCR a partir de moscas *Mhc-Gal4/+ ; UAS-CTG/+* alimentadas con p10 a diferentes concentraciones. Tras cuantificar la intensidad de las bandas obtenidas en la reacción de PCR no se detectaron diferencias significativas en los niveles de CUG(480) a ninguna concentración (Figura 14), demostrando que p10 no afectaba a la cantidad de transcritos.

### Ejemplo 8

#### *Estudio de la similitud existente entre las secuencias de p10 y Mbl*

Mediante un análisis bioinformático utilizando el programa de comparación de secuencias MEGA (www.megasoftware.net) se encontró que los aminoácidos de p10 alinean parcialmente con el reverso de una secuencia conservada del primer dedo de zinc de las proteínas Muscleblind, dominio a través del cual las proteínas se unen al ARN (Figura 15). En este alineamiento el Triptófano de p10 coincide con la posición de una Fenilalanina de Mbl (aminoácido también aromático, apolar e hidrofóbico), la cual media la unión de la proteína a las repeticiones CUG. Dada esta similitud, se decidió estudiar el efecto del péptido sobre la unión de Mbl a los ARNs tóxicos.

### Ejemplo 9

#### *Expresión y purificación de los dedos de Zinc de Mbl*

Para comprobar si el péptido era capaz de competir con Mbl en su unión a las repeticiones, se decidió llevar a cabo ensayos de unión entre ARN y proteína *in vitro*. Para realizar tales experimentos era necesario expresar y purificar la proteína Mbl. Se trabajó tan sólo con la porción de Mbl correspondiente a sus dedos de zinc (MblZF, aminoácidos 1-98) por diversos motivos. En primer lugar, en *Drosophila* existen 7 isoformas Mbl distintas. A excepción de la isoforma MblD, todas ellas comparten la región que contiene los dos dedos de zinc (extremo Nt) y difieren en sus secuencias Ct. Por otra parte, tanto los dedos de zinc de MBNL1 como de Mbl son suficientes para unirse a sus secuencias diana.

Durante la clonación en un vector derivado del vector comercial pET-15b, la proteína MblZF se fusionó a 6 Histidinas para facilitar su purificación, así como al sitio de corte de la proteasa TEV (del inglés *Tobacco Etch Virus*). Con el fin de encontrar las condiciones óptimas de expresión de MblZF en *E. coli* se ensayaron combinaciones de diversos factores. En primer lugar, se partió de tres cepas diferentes de bacterias. La cepa BL21 (DE3) es una cepa diseñada para sistemas de expresión basados en el promotor del bacteriófago T7. Esta cepa es adecuada para la expresión de proteínas recombinantes no tóxicas. En caso de que la proteína a expresar resulte tóxica, la cepa BL21 pLys (DE3) de *E. coli* presenta la ventaja de expresar de manera constitutiva bajos niveles de la lisozima T7, lo cual reduce la expresión basal de genes recombinantes al inhibir los niveles de RNA polimerasa T7. Por último, la cepa BL21 pLys (DE3) Codon + contiene genes que codifican tRNAs para codones humanos y que las bacterias tienen en niveles muy bajos. En segundo lugar, los dominios de dedos de zinc son dominios de unión a ácidos nucleicos que unen un átomo del ión zinc entre sus residuos de Cisteína e Histidina. El metal zinc es crucial para la estabilidad de este tipo de dominios ya que en su ausencia los dedos de zinc se despliegan y pierden la capacidad de unirse a sus dianas. Por ello, se ensayaron dos concentraciones distintas de  $\text{ZnCl}_2$  en todos los medios de cultivo empleados a lo largo de la expresión de la proteína MblZF (50  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ ). Las proteínas con dedos de zinc suelen ser, además, moléculas bastante insolubles e inestables. Por esta razón ensayamos dos temperaturas distintas de inducción, 30°C y 16°C. De

entre todas las combinaciones testadas conseguimos obtener una alta proporción de MblZF soluble al utilizar la cepa BL21 (DE3), una concentración de  $\text{ZnCl}_2$  de  $50 \mu\text{M}$  y una temperatura de inducción de  $16^\circ\text{C}$  con  $1 \text{ mM}$  de IPTG (Figura 16A).

5 El proceso de purificación se llevó a cabo por cromatografía de afinidad en un sistema FPLC, a lo largo del cual se mantuvo la presencia de zinc en el medio. El pico de elución de la proteína se produjo a aproximadamente  $300 \text{ mM}$  de imidazol (Figura 16B). La concentración de proteína total obtenida fue de  $2.73 \text{ mg/mL}$  ( $198 \mu\text{M}$ ; Figura 16C), lo que supone un rendimiento de  $1.4 \text{ mg}$  de proteína/L de cultivo. En posteriores tandas de purificación este valor no cambió de manera considerable.

10 Para comprobar que la proteína purificada se encontraba en su conformación nativa tras la purificación se analizó su espectro de dicroísmo circular (DC). El dicroísmo circular es una técnica de espectroscopia de absorción electrónica basada en la absorción diferencial de haces de luz circularmente polarizados a derecha e izquierda, por parte de una molécula. Debido a que proteínas diferentes poseen un espectro de dicroísmo circular distinto, esta técnica permite  
15 identificar la conformación de distintas moléculas comparando con un espectro teórico (Figura 17B). El espectro de dicroísmo circular obtenido para MblZF en tampón fosfato se asemeja al descrito para los dedos de zinc de MBNL1, con pico pronunciado a  $203 \text{ nm}$ , el cual denotaba falta de estructura, y un pico débil a  $220 \text{ nm}$ , indicador de hélice alfa (Figura 17A). En el caso de MblZF, este patrón se conservaba aunque los valores se encontraban ligeramente desplazados a la derecha (Figura 17C). Por último, con el fin de determinar si MblZF se encontraba como monómero en solución o formando complejos llevamos a cabo cromatografía de exclusión molecular (Figura 17D). La cromatografía de exclusión molecular es un método de cromatografía en columna por el cual las moléculas se separan según su peso molecular. El volumen de exclusión obtenido para MblZF correspondía con un peso molecular de  $13.4 \text{ kDa}$ , equivalente al tamaño de la proteína en forma de monómero. El cromatograma reveló un único pico de elución, lo cual demuestra que MblZF no forma complejos consigo mismo en solución, al menos en las condiciones del ensayo.

25

#### Ejemplo 10

##### *p10 se une a repeticiones CUG in vitro pero no compete con MblZF*

30

De entre las diferentes técnicas para el estudio *in vitro* de interacciones entre proteínas y ácidos nucleicos destacan por su rapidez y sensibilidad los ensayos de polarización de fluorescencia (FP). Esta técnica se basa en los cambios en el movimiento rotacional de moléculas fluorescentes en suspensión. Así, cuando un haz de luz polarizada excita a un fluoróforo conjugado a una molécula pequeña, ésta sufre difusión rotacional más rápido que el tiempo necesario  
35 para que ocurra la emisión de luz, lo que resulta en una disposición al azar de la molécula en el momento de emisión de fluorescencia (despolarización). Sin embargo, la rotación de la molécula se vuelve más lenta cuando la viscosidad del medio o el volumen molecular cambian, aumentando la polarización de la luz emitida. De esta manera, midiendo los cambios en la polarización de una molécula se puede detectar la unión entre ésta y otra añadida al medio (Figura 18). En la presente invención, estas moléculas eran p10, MblZF y 23 repeticiones CUG conjugadas al fluoróforo carboxifluoresceína (FAM-(CUG)23).

40

Para poner a punto el experimento de FP se ensayaron en primer lugar dos concentraciones distintas del ARN FAM-(CUG)23 ( $6 \text{ nM}$  y  $60 \text{ nM}$ ). En ambos casos se pudo detectar el ARN y se observó un incremento significativo en los valores de polarización de fluorescencia al añadir MblZF ( $p\text{-valor} < 0.0001$ ), indicando que se había producido unión.  
45 Con el fin de reducir tanto el gasto de sonda como de proteína se decidió trabajar a una concentración de FAM-(CUG)23 de  $6 \text{ nM}$ . La interacción observada entre MblZF y FAM-(CUG)23 era proporcional a la cantidad de proteína (Figura 19B). El análisis estadístico de la curva de unión dio lugar a una  $\text{IC}_{50}$  teórica de  $900 \text{ nM}$ . Con el fin de comprobar la especificidad de esta unión se llevaron a cabo estudios de competencia con un ARN no marcado, (CUG)23 (1:10, 1:100 y 1:200 respecto a FAM-(CUG)23). En todos los casos se observó competencia a todas las concentraciones de sonda no marcada ensayadas (Figura 19A). p10 también causó un leve incremento en la polarización de FAM-(CUG)23 ( $p\text{-valor}$ :  $0.0176$ ; Figura 19D). Sin embargo, la adición de cantidades crecientes de p10 no dio lugar a una curva de unión, posiblemente debido al pequeño tamaño de p10 (Figura 19D). La coadición de p10 y MblZF a FAM-(CUG)23 causó un incremento en la polarización del ARN mayor que el provocado por la adición de MblZF sólo ( $p\text{-valor}$ :  $0.0158$ ; Figura 19C). Este resultado indica que ambas moléculas pueden unirse al ARN sin interferir con la unión  
55 de la otra. No obstante, el incremento en los valores de polarización tras la coadición de MblZF y de p10 era menor que la suma de incrementos causados por ambos por separado ( $\Delta\text{mP}(\text{Mbl})$ :  $99.5$ ;  $\Delta\text{mP}(\text{p88})$ :  $21.75$ ;  $\Delta\text{mP}(\text{Mbl}+\text{p88})$ :  $108.25$ ), lo que no descarta que exista competencia parcial.

60

Los cambios sobre el ARN producidos por p10 en el ensayo de FP son pequeños, probablemente debido al bajo peso molecular de la molécula (inferior a  $900 \text{ Da}$ ). Por esta razón, se decidió complementar el estudio con experimentos de retardo en gel. Estos ensayos se basan en las diferencias en la movilidad electroforética entre complejos estables proteína-ácido nucleico y sus componentes por separado. Debido a que se disponía del ARN FAM-(CUG)23 se decidió poner a punto un ensayo de retardo en gel fluorescente. Tras determinar la cantidad de ARN óptima para la detección ( $60 \text{ nM}$ ; Figura 20A) se estudió la unión entre éste y MblZF. Dicha unión provocó tanto una disminución en la intensidad de la banda correspondiente al ARN libre en el gel como la aparición de señal en el interior del pocillo de los geles (ARN unido). Sin embargo, no se observaron bandas de retardo en el gel, indicando que todos los complejos formados tras la unión quedaban retenidos en el pocillo. La señal en el interior del pocillo disminuía al competir la unión con sonda (CUG)23 no marcada (1:100) demostrando la especificidad de la interacción. Además, la unión no  
65

## ES 2 365 967 A1

tenía lugar si el ARN fluorescente se incubaba con la proteína MblZF desnaturalizada por calor, ni si la reacción se llevaba a cabo entre FAM-(CUG)23 y una proteína distinta (colágeno  $\alpha 3$ ) a la misma concentración que MblZF, de nuevo confirmando la especificidad de la unión (Figura 20B).

5 Con el fin de descartar que FAM-(CUG)23 pudiese unirse a una etiqueta de 6 Histidinas de MblZF, se eliminaron éstas mediante digestión con la proteasa TEV (Figura 21A-C). La proteína MblZF sin Histidinas (MblZF<sup>ΔHis</sup>) mantenía la capacidad de unión al ARN (Figura 21D).

10 La retención de los complejos formados entre MblZF y FAM-(CUG)23 en el pocillo podría deberse a la formación de agregados de gran tamaño entre el ARN y la proteína. Con el fin de disminuir el tamaño de dichos complejos utilizamos un ARN de 4 repeticiones CUG (FAM-(CUG)4). Los dedos de zinc de MBNL1 pueden unirse a repeticiones CUG formadas por un mínimo de 4 tripletes siempre y cuando se facilite la formación del lazo o “loop” añadiendo 4 nucleótidos no complementarios hacia la mitad de la secuencia. Tal y como se muestra en la Figura 20C, MblZF se unió a FAM-(CUG)4 pero el complejo formado quedó igualmente retenido en el pocillo.

15 El punto isoeléctrico (pI) de MblZF es 9.5. El pH del tampón de electroforesis utilizado en nuestros ensayos es de 8.5, lo que significa que la carga total de MblZF en el gel es positiva. Los geles de retardo son geles no desnaturalizantes, por lo que no hay SDS presente en el medio que confiera carga negativa a la molécula para que ésta migre hacia el polo positivo. En general, en los ensayos de retardo en gel esto no suele ser un inconveniente, ya que el ARN tiene carga negativa y es capaz de arrastrar al complejo durante la electroforesis. No obstante, se decidió comprobar que FAM-(CUG)23 podía movilizar a MblZF corriendo el complejo en un gel horizontal de agarosa al 2.5% con los pocillos colocados en medio y tiñéndolo con Coomassie (Figura 22A). En este experimento la proteína MblZF sola migró hacia el polo negativo, en dirección contraria al marcador de peso molecular de proteínas. Cuando MblZF se incubó con FAM-CUG(23), la cantidad de proteína que migraba hacia el polo negativo (probablemente proteína no unida) disminuyó, pero seguía sin aparecer señal hacia el lado positivo del gel, incluso si la electroforesis se llevaba a cabo a un pH de 10.5, superior al pI de MblZF (Figura 22B).

20 Con el fin de otorgar la carga negativa necesaria, se fijó el complejo FAM-(CUG)23-MblZF entrecruzamiento con formaldehído (FA) y se corrió la reacción en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (en presencia de SDS; Figura 22C) o, alternativamente, añadiendo Serva Blue G el cual confiere carga a las proteínas sin desnaturalizarlas. En ningún caso conseguimos que el complejo penetrase en el interior del gel.

25 Con el fin de determinar si p10 podía unirse a moléculas de ARN CUG, se decidió llevar a cabo un experimento de retardo en gel similar entre el péptido y FAM-(CUG)23. p10 se unió al ARN quedando parte del complejo retenido en el pocillo, tal y como se ha descrito para MblZF. No obstante, en este caso se pudo observar una banda de retardo en el interior del gel (Figura 23A). p10 se unía a FAM-(CUG)23 a concentraciones de péptido elevadas (500  $\mu$ M en adelante, Figura 23B), indicando una baja afinidad entre ambas moléculas, al menos en las condiciones del ensayo. Esta afinidad se reducía al disminuir el tamaño de las repeticiones (FAM-(CUG)4, Figura 23C). Con el objetivo de determinar si p10 podía competir con MblZF por la unión al ARN, se incubaron ambos en presencia de FAM-(CUG) 23. p10 no impidió la unión de MblZF, ya que en este caso todo el ARN quedó retenido en el pocillo (Figura 23D). Esto podría deberse bien a un efecto sinérgico entre la proteína y el péptido o a un efecto aditivo si ambos se uniesen a sitios diferentes del ARN.

### 45 Ejemplo 11

*p10 se une a repeticiones CUG con mayor afinidad que a otras secuencias*

50 Con el fin de estudiar la especificidad de la unión observada entre p10 y las repeticiones CUG se llevaron a cabo dos experimentos. En primer lugar, se ensayaron los cinco hexapéptidos generados durante el rastreo de alaninas. Ninguno de ellos se unió de manera significativa a FAM-(CUG)23 (Figura 24A), demostrando que todos los residuos de p10 son necesarios para su interacción con el ARN. De manera interesante, estos péptidos no suprimieron la toxicidad del transgén CTG(480) en *Drosophila*, indicando que la capacidad de unión de p10 a repeticiones CUG es necesaria para su actividad *in vivo*. En segundo lugar, se estudió el efecto de p10 sobre otras secuencias de ARN y ADN, tanto de doble cadena como de cadena sencilla, marcadas fluorescentemente con carboxifluoresceína (FAM) (Figura 24C). Dichas moléculas incluían (1) un ARN de cadena sencilla formado por 19 nt de la región 3'UTR del gen *DMPK* (ARNcs), (2) un ARN formado por 4 repeticiones CUG fusionadas a la secuencia de cadena sencilla de *DMPK* (ARNdc+cs), (3) un ARN capaz de formar un horquilla de doble cadena perfecta formada por 4 repeticiones CAG CUG (ARNdc), (4) un ADN formado por 4 repeticiones CTG (ADNdc) y (5) un ADN correspondiente a los mismos 19 nt de la región 3'UTR del gen *DMPK*. p10 se unió en todos los casos (Figura 24B). Además, un ARN mutado no marcado de secuencia (GUC)4 (al cual los dedos de Zinc de la proteína MBNL1 humana no se unen) y ARNt desplazaron la unión entre p10 y FAM-(CTG)23. En conjunto, estos datos indican que la unión de p10 al ARN era específica de secuencia (ya que otros hexapéptidos mostraban un comportamiento diferente) y que el péptido podía unirse a más de un solo tipo de ácido nucleico.

65 Sin embargo, era posible que p10 se uniese con afinidad diferente a cada una de las secuencias estudiadas. Debido a que los complejos péptido-ARN y péptido-ADN detectados en los experimentos de retardo en gel quedaban retenidos en el pocillo, la determinación de constantes de disociación ( $K_d$ ) para cada interacción no fue posible. Con el fin de

cuantificar la unión entre p10 y dichos ácidos nucleicos, así como descartar que el péptido se estuviese uniendo a la carboxifluoresceína en todos los casos, se decidió poner a punto un experimento de extinción de la fluorescencia intrínseca del Triptófano presente en la secuencia de p10. El Triptófano tiene un máximo de absorción a una longitud de onda de 280 nm y un pico de emisión máximo entre 300 y 350 nm (en función de la polaridad del solvente). La fluorescencia de este residuo cambia cuando la conformación de la proteína en la que se encuentra se ve modificada por, por ejemplo, su unión a otra molécula. Así, se incubaron cantidades crecientes de las moléculas de ARN DMPK-CUG4, DMPK y CAG CUG4, así como los ADN's CTG4 y DMPK con una cantidad fija de p10 (5  $\mu$ M), y se midieron cambios en la emisión de fluorescencia del péptido a 351 nm. En todos los casos la señal disminuyó de manera proporcional a la cantidad de ARN o ADN añadida al medio, confirmando la unión observada anteriormente. Sin embargo, la representación en una recta de la fluorescencia emitida para cada punto de concentración relativa a la fluorescencia del péptido libre dio lugar a rectas con pendientes diferentes, indicando que la tasa de extinción de fluorescencia (y con ello la afinidad de la unión) era distinta entre los distintos ácidos nucleicos (Figura 25). La pendiente de la curva era significativamente mayor para la molécula DMPK-CUG4 ( $-0.034 \pm 0.003$ ) que para CTG4 ( $-0.019 \pm 0.005$ ) y DMPK (ARN:  $-0.024 \pm 0.003$  y ADN:  $-0.028 \pm 0.002$ ) (p-valor $<0.01$ ). Sin embargo para el ARN CAG CUG ( $-0.028 \pm 0.003$ ) esta diferencia no era estadísticamente significativa (p-valor $>0.1$ ; Figura 25B). La molécula DMPK-CUG4 contenía las repeticiones CUG en su entorno de DMPK. En conjunto, esto indicaba que existía selectividad de unión por parte del péptido a sus dianas, por que era posible que *in vivo* se uniese de manera preferente a los ARN tóxicos.

#### Ejemplo 12

##### *p10 provoca un cambio conformacional en las repeticiones CUG*

Con el fin de estudiar posibles cambios en la estructura secundaria del ARN inducidos por p10, se llevó a cabo en primer lugar un experimento de dicroísmo circular (DC) utilizando un ARN con repeticiones CUG no marcadas (CUG60). El dicroísmo circular de los ácidos nucleicos viene dado por el apilamiento de las bases que conforman su secuencia. Por lo tanto, cuando una molécula se une al ARN, afectando a su estructura, se detecta un cambio en su espectro de DC. Incubar el ARN CUG60 (1  $\mu$ M) con la proteína MblZF (1  $\mu$ M y 1.5  $\mu$ M) redujo la intensidad de la señal emitida por éste, aunque no desplazó el valor de longitud de onda del pico en el espectro (Figura 26A), indicando que la unión de MblZF afectaba al empaquetamiento de las bases del ARN. Cuando incubamos el ARN con concentraciones crecientes del péptido de SEQ ID NO: 10 (0.1  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M y 20  $\mu$ M) se observó un efecto similar (Figura 26B). Durante las lecturas, el ARN se mantuvo en la cubeta en el interior del dicrógrafo a 10°C. A lo largo de las 3 horas que dura cada experimento era posible que el ARN se hubiese degradado, explicando esto la disminución en la intensidad de la señal observada. Para descartar esta posibilidad, se midió el espectro de DC del ARN CUG60 a tiempos 0 y 3 h, habiéndose mantenido éste a 10°C en todo momento. A las 3 horas el espectro de CUG60 no mostró cambios respecto al espectro obtenido a tiempo 0, demostrando que los efectos observados eran específicos (Figura 26D). Además, los péptidos p29.1 (0.5  $\mu$ M y 1  $\mu$ M) y p29.4 (1  $\mu$ M) del rastreo de alaninas no cambiaron el espectro del ARN (Figura 26E y 26F), confirmando la especificidad de la unión. Por último, cuando se añadió MblZF (0.5  $\mu$ M) seguido de p10 (0.5  $\mu$ M), o viceversa, al ARN no se observó un incremento en la señal de DC, lo que sugiere que los cambios producidos en el ARN por uno de ellos no son reversibles por la adición posterior del otro.

Estos resultados demuestran que p10 disminuye el apilamiento de las bases del ARN y, por tanto, afectaba a la conformación secundaria de la molécula. Con el fin de confirmar si dichos cambios causan una pérdida de la estructura en horquilla se llevó a cabo un experimento utilizando un ARN formado por 23 repeticiones CUG en el que una guanina había sido sustituida por su análogo 2-amino purina (2-AP-(CUG)23). Cuando la 2-AP se encuentra en un entorno de cadena sencilla emite fluorescencia a 375 nm. Sin embargo, dicha emisión se extingue significativamente cuando la molécula se encuentra formando parte de una doble hélice. A concentraciones bajas de MblZF y de p10, para las cuales se había detectado unión en los experimentos de DC y Trp-FQ (ARN:proteína  $\leq 1:5$ ), ninguno de los dos produjo cambios en la fluorescencia de la 2-AP (Figura 27A-B). Sin embargo, al aumentar la concentración de p10 a 100  $\mu$ M (ARN:péptido 1:100) el ARN 2AP-(CUG)23 sufrió un cambio conformacional de doble cadena a cadena sencilla, con un incremento de 2.9 veces en la emisión de fluorescencia de la molécula (Figura 27B). Con el fin de confirmar la especificidad de este efecto, se llevó a cabo el mismo experimento incubando los péptidos del rastreo de alaninas (payawe y ppyawa) con el ARN 2-AP-(CUG)23 a la misma concentración que p10 (100  $\mu$ M). Ninguno de estos péptidos produjo cambios en la emisión de fluorescencia, así como tampoco lo hizo el DMSO por sí sólo (Figura 27C). Por tanto, estos resultados indican que p10 es capaz de desestabilizar la doble hebra formada por las repeticiones CUG y confirman que MblZF y el péptido se unen de manera diferente al ARN.

#### Ejemplo 13

##### *Validación del efecto de p10 en un modelo de DM1 en ratón. Estudio de la toxicidad de p10 en mamíferos*

Con el fin de estudiar el posible efecto tóxico de p10 en mamíferos y establecer la dosis máxima tolerable para posteriores ensayos, se administró el péptido a ratones de la cepa salvaje *FVB*. Debido a la baja absorción de los péptidos por las paredes del intestino se decidió llevar a cabo inyecciones intramusculares en el músculo tibial anterior de animales de 4-5 semanas de edad utilizando cuatro dosis diferentes (0.5  $\mu$ g, 1  $\mu$ g, 10  $\mu$ g y 100  $\mu$ g) con un total de 6

## ES 2 365 967 A1

ratones por dosis (3 hembras y 3 machos). Pasadas 4 semanas tras la inyección, los animales se sacrificaron y se llevó a cabo una autopsia visual, así como un estudio histomorfológico del músculo y análisis de sangre (Figura 28). Como control se utilizaron animales inyectados con la misma cantidad de DMSO (0.2% para las dosis 0.5  $\mu\text{g}$  y 1  $\mu\text{g}$  y 2% para los dosis 10  $\mu\text{g}$  y 100  $\mu\text{g}$ ).

La autopsia visual y el análisis histológico de los músculos de los animales tratados no revelaron diferencias significativas respecto a los controles con DMSO. En algunos casos se observaron signos de mixedematosis leve (acumulación de líquido) y, en ocasiones, una ligera inflamación, probablemente causados por la propia inyección (Figura 28). Los análisis de sangre, no obstante, sí que mostraron diferencias entre los animales tratados y los control. Como marcador de actividad renal se midió la cantidad de ácidos biliares, urea y creatinina en sangre. El enzima creatinafosfoquinasa (CPK) se usó como marcador de daño en músculo esquelético y corazón, y la fosfatasa alcalina (FA), la gama glutamil transpeptidasa (GGT) y la glutamato piruvato transaminasa (GPT) como marcadores de daño hepático. Todos los animales (incluidos los control) mostraban valores de urea y FA elevados respecto a los valores estándar. Además, los animales control sometidos a DMSO al 2% presentaban valores de GPT y CPK anormalmente altos. Esto podría deberse a la toxicidad del DMSO o a la propia inyección. No obstante, las dosis 10  $\mu\text{g}$  y 100  $\mu\text{g}$  mostraron valores aún mayores de urea y GPT en sangre que sus controles. La urea es el resultado final del metabolismo de las proteínas. Esta se forma en el hígado y se elimina en la orina. Si el riñón no funciona correctamente la urea se acumula en la sangre. La GPT es una enzima presente en gran concentración en el hígado y en menor medida en los riñones, corazón y músculos. Cuando existe una lesión de estos órganos, la enzima es liberada a la sangre y aparece elevada en los análisis. Además, cabe destacar que dos de los ratones tratados con la dosis 100  $\mu\text{g}$  murieron aproximadamente 11 días después de la inyección (d/i), confirmando la toxicidad de de p10 a partir de un punto umbral. De uno de estos dos animales pudo extraerse sangre momentos antes de su muerte. Este ratón presentaba valores extremadamente altos de urea, creatinina, CPK y GGT en sangre (p.e., un valor 28 veces mayor para la CPK que el límite superior de los valores estándar y 15 veces mayor que su control con DMSO).

### Ejemplo 14

#### *p10 revierte los defectos de splicing de los transcritos *Serca1* y *Tnnt3* en ratones *HSA<sup>LR</sup>**

p10 suprimía el efecto de CTG(480) en el SNC, músculo y ojo de *Drosophila* y se unía a repeticiones CUG *in vitro*. Para validar la relevancia de estos resultados en modelos de DM1 en mamíferos, se decidió ensayar p10 en ratones *HSA<sup>LR</sup>*. Estos ratones expresan 250 repeticiones CUG en un transcrito heterólogo, la actina esquelética humana (human skeletal actin, HSA) y reproducen la mayoría de síntomas de la DM1, incluyendo defectos en el *splicing* alternativo de transcritos. Uno de los ejemplos más claros de *splicing* alterado tanto en pacientes como en ratones *HSA<sup>LR</sup>* es el del exón 22 de los transcritos de la ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  *Serca1*. En la población sana, dicho exón se excluye en las formas fetales y se incluye en el adulto. Sin embargo, tanto en los pacientes como en los ratones *HSA<sup>LR</sup>* el exon 22 se excluye a lo largo de toda la vida, manteniéndose así un patrón fetal en los individuos adultos. La proteína *Tnnt3* se encuentra en los sarcómeros de las fibras musculares rápidas en el músculo esquelético. Sus transcritos sufren *splicing* alternativo del denominado exón fetal F. En la población sana este exón está ausente en los individuos adultos, mientras que en los pacientes de DM1 y ratones *HSA<sup>LR</sup>* el exón fetal se mantiene.

Con el fin de determinar si p10 podía revertir los defectos de *splicing* de *Serca1* y *Tnnt3* en los ratones *HSA<sup>LR</sup>*, se llevaron a cabo inyecciones intramusculares del péptido a dos dosis: 0.5  $\mu\text{g}$  y 10  $\mu\text{g}$ . Los animales tratados se sacrificaron 1 semana, 2 semanas y 4 semanas después de la inyección, y se diseccionó el músculo tibial anterior tanto de la pata derecha (inyectada con p10) como de la izquierda (inyectada con suero salino con DMSO al 0.2% para la dosis 0.5  $\mu\text{g}$  y al 2% para la dosis 10  $\mu\text{g}$ ). Como control se utilizaron animales *FVB* y animales *HSA<sup>SR</sup>* (los cuales expresan 5 repeticiones CUG en transcritos de la actina esquelética humana) inyectados en ambas patas de manera similar, así como ratones *HSA<sup>LR</sup>* en los que se inyectó suero con DMSO en las dos extremidades.

El análisis mediante RT-PCR de los transcritos de *Serca1* y *Tnnt3* de animales tratados con 0.5  $\mu\text{g}$  no reveló cambios significativos en la inclusión de los exones 22 y fetal F respectivamente, a ninguno de los tiempos ensayados (geles no mostrados). Sin embargo, en 2 de 5 los animales inyectados con 10  $\mu\text{g}$ , p10 revirtió los defectos de *splicing* en ambos casos (Figura 29A-C). Debido al complejo patrón de bandas obtenido para los transcritos de *Tnnt3* no pudimos cuantificar de forma precisa el incremento en el porcentaje de exclusión del exón fetal F inducido por p10. En el caso de *Serca1*, p10 aumentó el porcentaje de inclusión del exón 22 en un 1.3% (1 semana d/i, p-valor>0.05), 25.9% (2 semanas d/i, p-valor<0.05) y 38.3% (4 semanas d/i, p-valor<0.01) (Figura R40D). Por último, p10 no afectó al *splicing* de los transcritos musculares del gen *Capzb*, los cuales se utilizaron como control de especificidad ya que su procesado no está alterado en los ratones modelo *HSA<sup>LR</sup>* (Figura 29A-C).

El análisis del procesado de los transcritos de *Serca1* en las patas derecha (inyectada con p10) e izquierda (inyectada con suero y 2% DMSO) procedentes de un mismo animal a las 4 semanas d/i, reveló que en la extremidad no tratada el porcentaje de inclusión del exón 22 era mayor con respecto al mostrado por los animales *HSA<sup>LR</sup>* inyectados con DMSO en ambas patas (Figura 30). Esto indica que la cantidad de p10 que llegaba al músculo tibial anterior de la extremidad izquierda a través de la sangre era suficiente para revertir parcialmente los defectos de *splicing* de manera sistémica.

Ejemplo 15

*p10 revierte defectos histológicos en el músculo de ratones HSA<sup>LR</sup>*

5 La principal característica a nivel histológico tanto de la DM1 como de los animales *HSA<sup>LR</sup>* es la presencia de núcleos centrales en las fibras musculares. La inyección de 0.5  $\mu\text{g}$  y 10  $\mu\text{g}$  en el músculo tibial anterior de estos animales redujo de manera significativa el porcentaje de células con núcleos centrales respecto a los animales *HSA<sup>LR</sup>* tratados con DMSO, mientras que no produjo cambios en los ratones *FVB* (Figura 31). Este efecto era más pronunciado transcurridas 4 semanas tras la inyección, indicando que se trataba de un proceso lento.

10

En conjunto, los resultados obtenidos en los ratones modelo validan el potencial terapéutico de p10 en mamíferos, abriendo nuevas vías de estudio en la búsqueda de tratamientos para la DM1 y DM2 y SCA8.

15 **Bibliografía**

• **García-López, A., Monferrer, L., García-Alcover, I., Vicente-Crespo, M., Álvarez-Abril, M. C., & Artero, R. D. (2008).** Genetic and chemical modifiers of a CUG toxicity model in *Drosophila*. *PLoS One*, 3, el 595.

20 • **Mankodi, A., Logigian, E., Callahan, L., McClain, C., White, R., Henderson, D., et al. (2000).** Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science*, 289, 1769-1773.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Compuesto que comprende un hexapéptido de Fórmula I, sales, derivados, o estereoisómeros farmacéuticamente aceptables del mismo:

**A-B-C-D-E-F**

(I)

10

donde:

15 **A** puede ser cualquiera de los aminoácidos **c** ó **p**,

**B** puede ser cualquiera de los aminoácidos **p** ó **q**,

**C** es el aminoácido **y**,

20 **D** puede ser cualquiera de los aminoácidos **a** ó **t**,

**E** puede ser cualquiera de los aminoácidos **q** ó **w**, y

25 **F** es el aminoácido **e**.

2. Compuesto, según la reivindicación 1, seleccionado del grupo: SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 19.

30 3. Compuesto, según la reivindicaciones 1 ó 2, que consiste en un hexapéptido de secuencia SEQ ID NO: 10.

4. Compuesto, según las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque los aminoácidos que forman parte de la Fórmula I son L-aminoácidos, D-aminoácidos o mezclas de los mismos.

35 5. Compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende un hexapéptido de Fórmula I en configuración directa o retroinversa.

6. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para preparar un medicamento.

40 7. Uso de al menos un compuesto de las reivindicaciones 1 a 5, según la reivindicación 6, para la elaboración de una composición farmacéutica destinada a la prevención y/o tratamiento de enfermedades cuya etiología se basa en la presencia de transcritos tóxicos que comprenden repeticiones CUG o CCUG, comprendidas en el grupo: DM1, DM2 y SCA8.

45 8. Composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de las reivindicaciones 1 a 5.

50

55

60

65

**Figura 1**

**A**

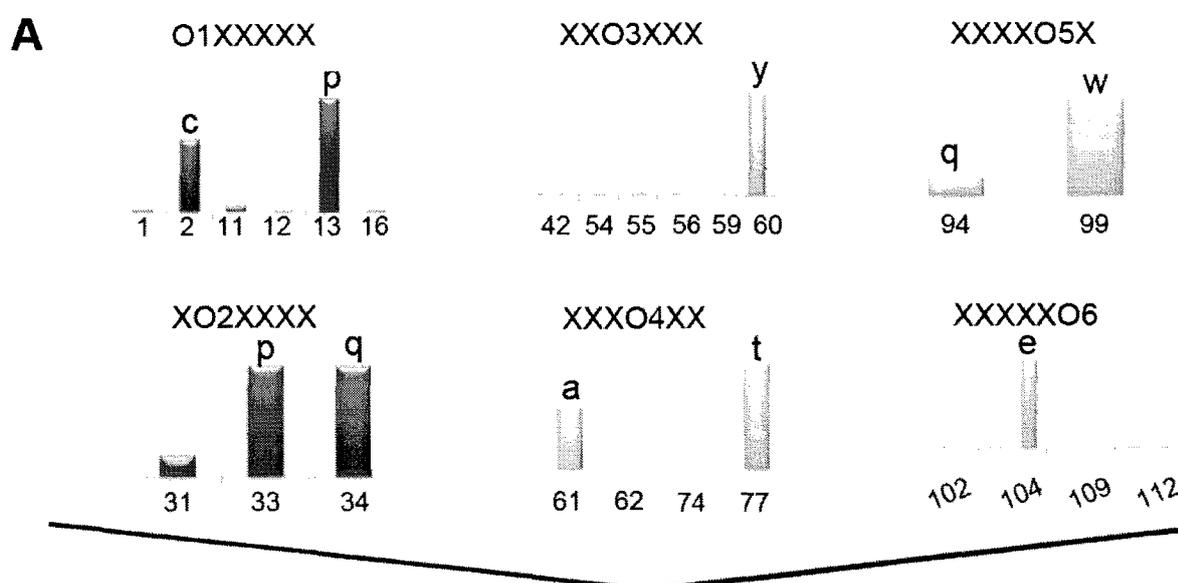
Ac-O1XXXXX-NH2  
 Ac-XO2XXXX-NH2  
 Ac-XXO3XXX-NH2  
 Ac-XXXO4XX-NH2  
 Ac-XXXXO5X-NH2  
 Ac-XXXXXO6-NH2

**B**

	O1	O2	O3	O4	O5	O6
A	AXXXXX	XAXXXX	XXAXXX	XXXAXX	XXXXAX	
B	BXXXXX	XBXXXX	XXBXXX	XXXBXX	XXXXBX	XXXXXB
C	CXXXXX	XCXXXX	XXCXXX	XXXCXX	XXXXCX	XXXXXC
D	DXXXXX	XDXXXX	XXDXXX	XXXDXX	XXXXDX	XXXXXD
.....						
Y	YXXXXX	XYXXXX	XXYXXX	XXXYXX	XXXXYX	XXXXXY



**Figura 2**



**B**

- |               |               |
|---------------|---------------|
| Ac-cpyaqe-NH2 | Ac-ppyaqe-NH2 |
| Ac-cpyawe-NH2 | Ac-ppyawe-NH2 |
| Ac-cpytqe-NH2 | Ac-ppytqe-NH2 |
| Ac-cpytwe-NH2 | Ac-ppytwe-NH2 |
| Ac-cqyaqe-NH2 | Ac-pqyaqe-NH2 |
| Ac-cqyawe-NH2 | Ac-pqyawe-NH2 |

**Figura 3**

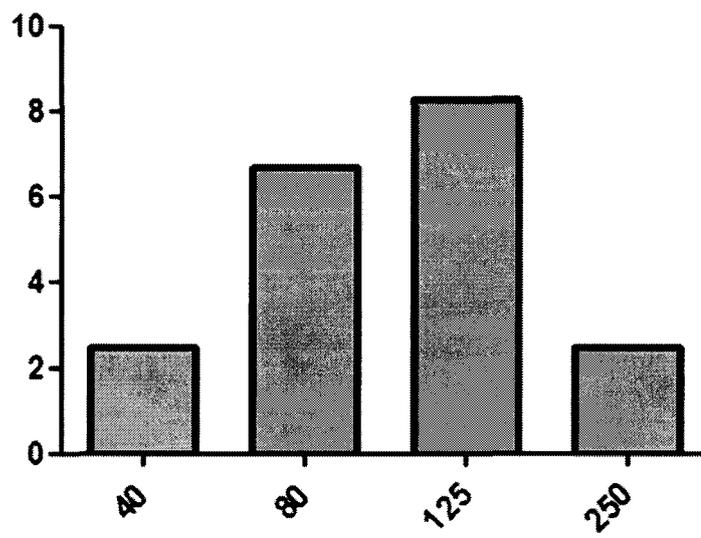
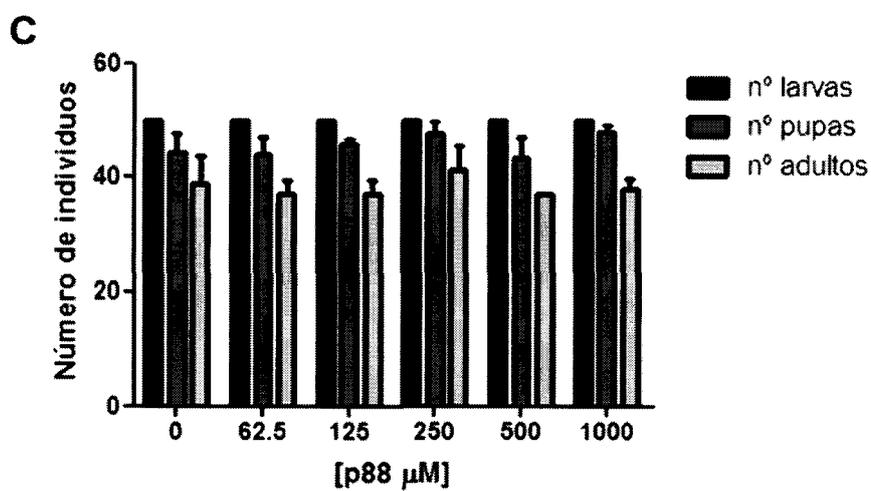
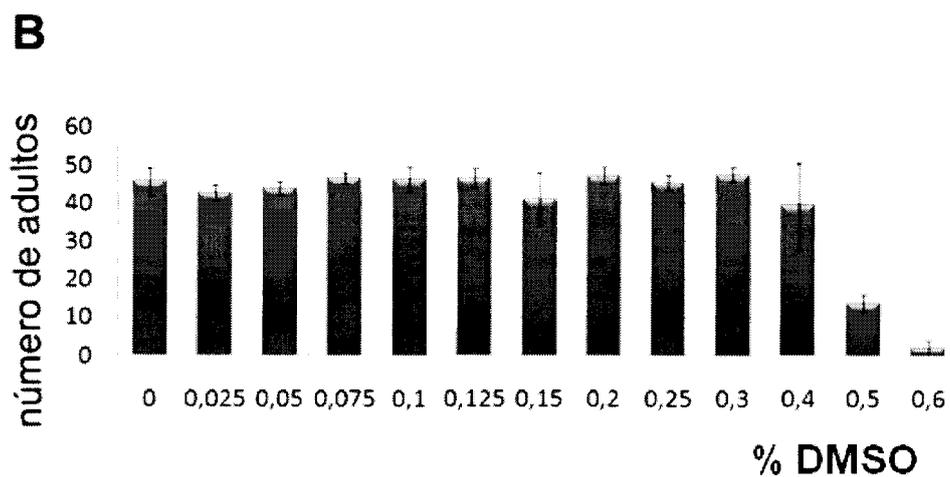
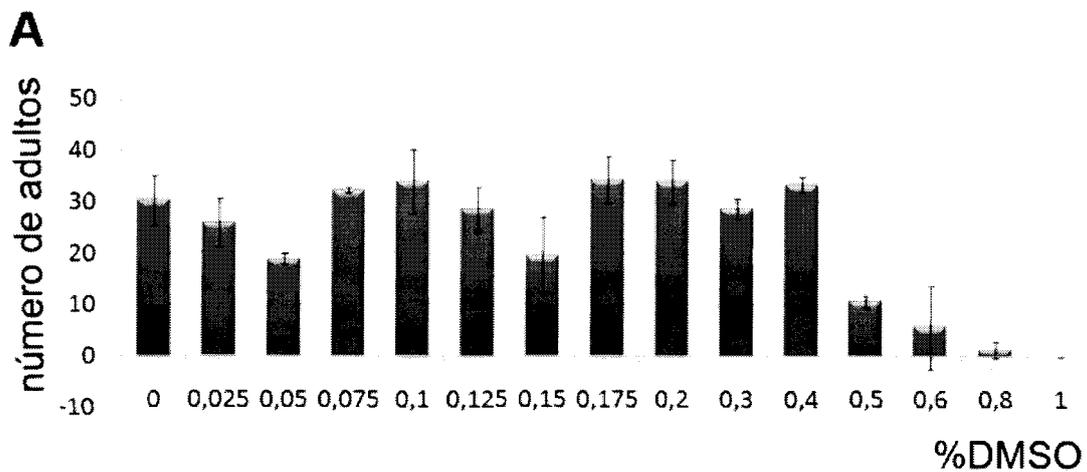
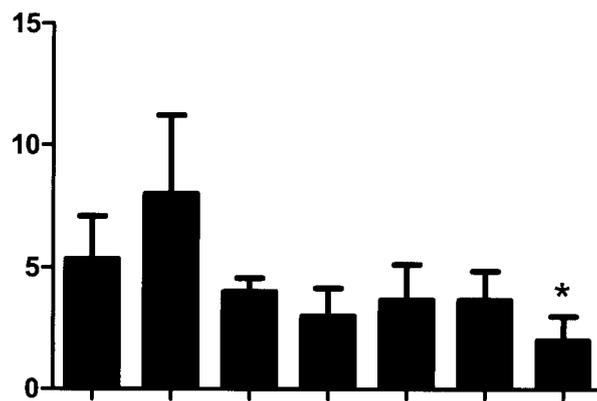


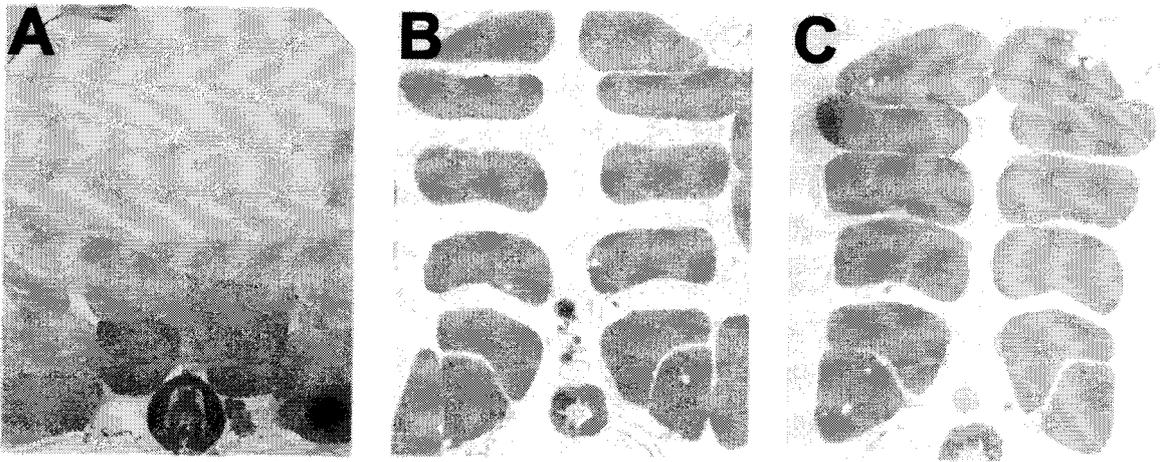
Figura 4



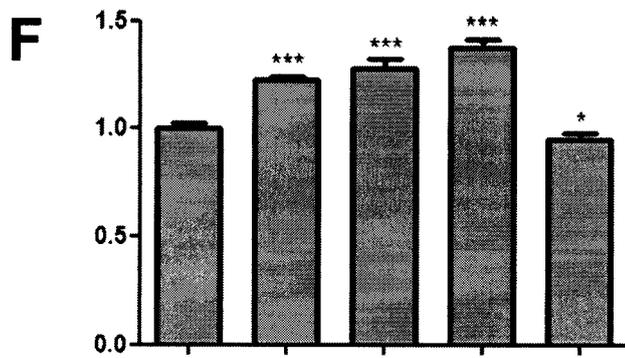
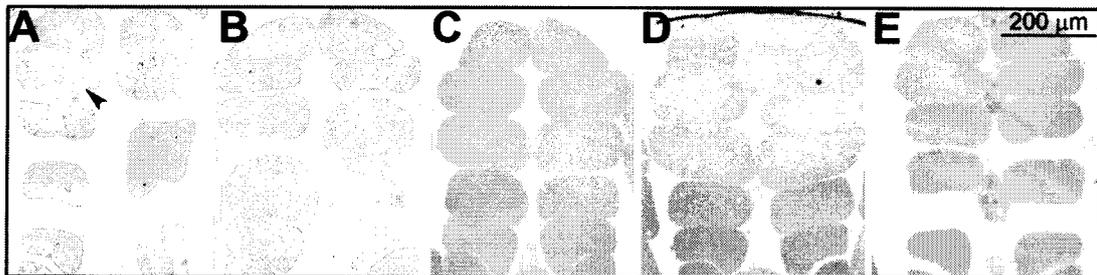
**Figura 5**



**Figura 6**



**Figura 7**



**Figura 8**

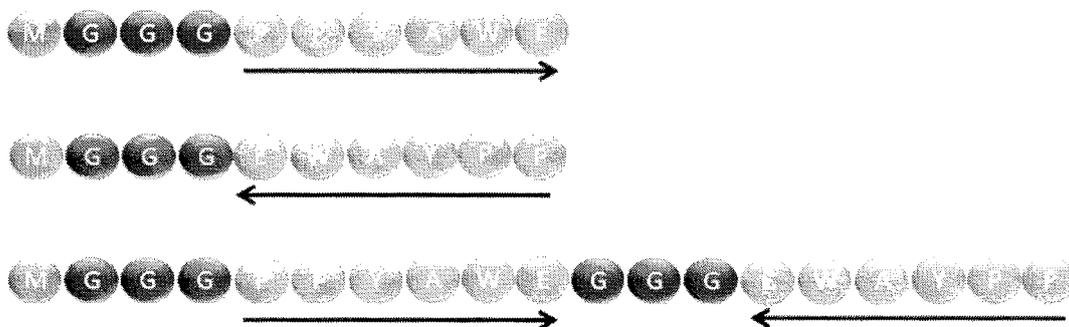


Figura 9

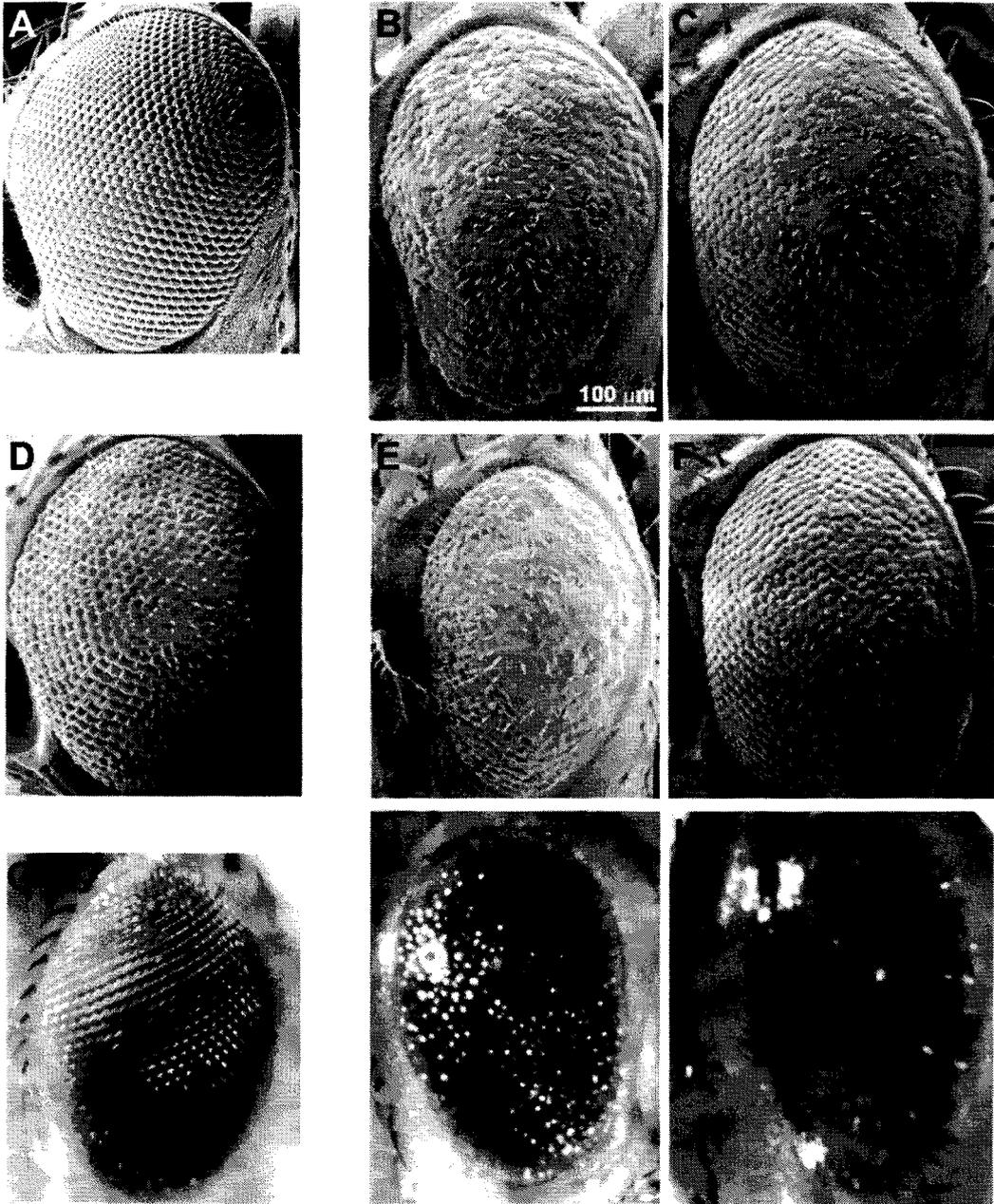


Figura 10

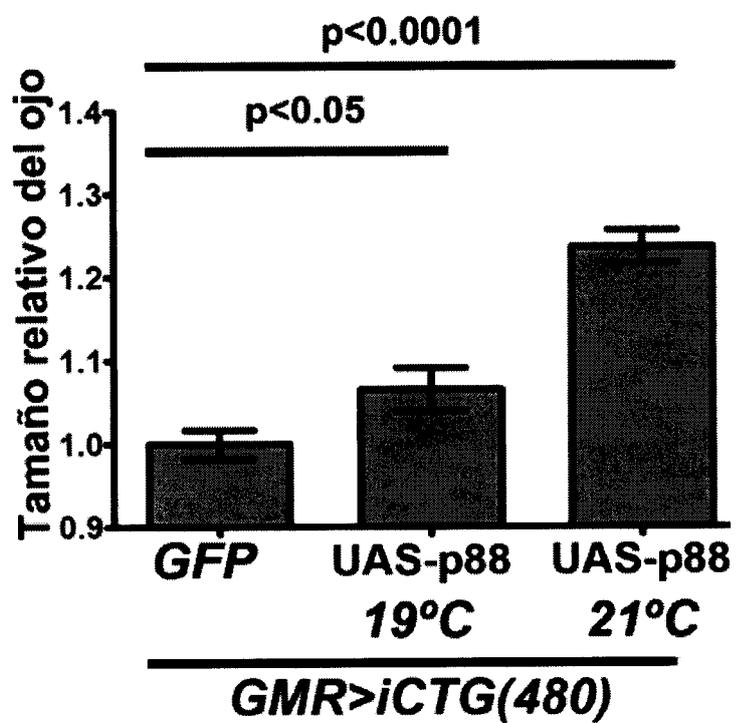
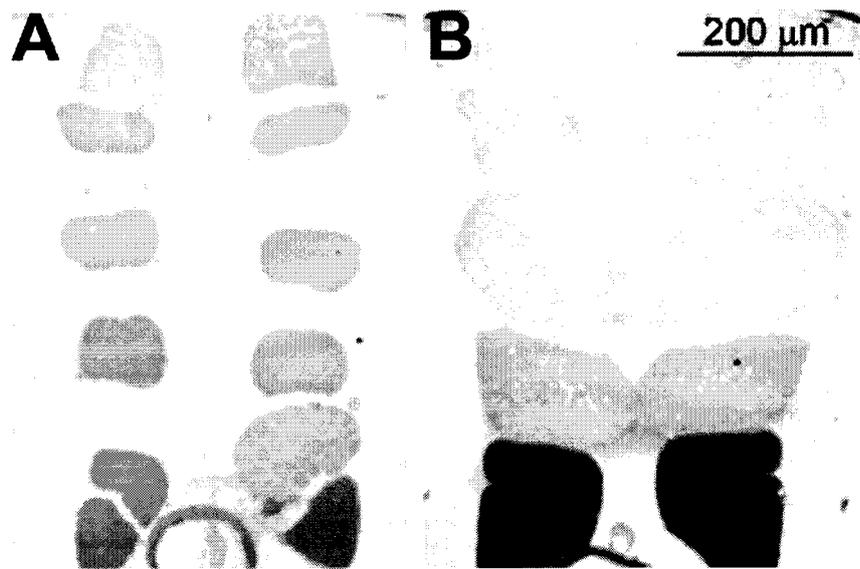


Figura 11



C

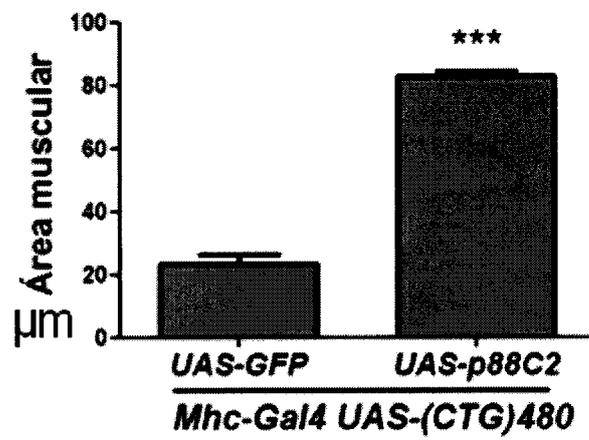
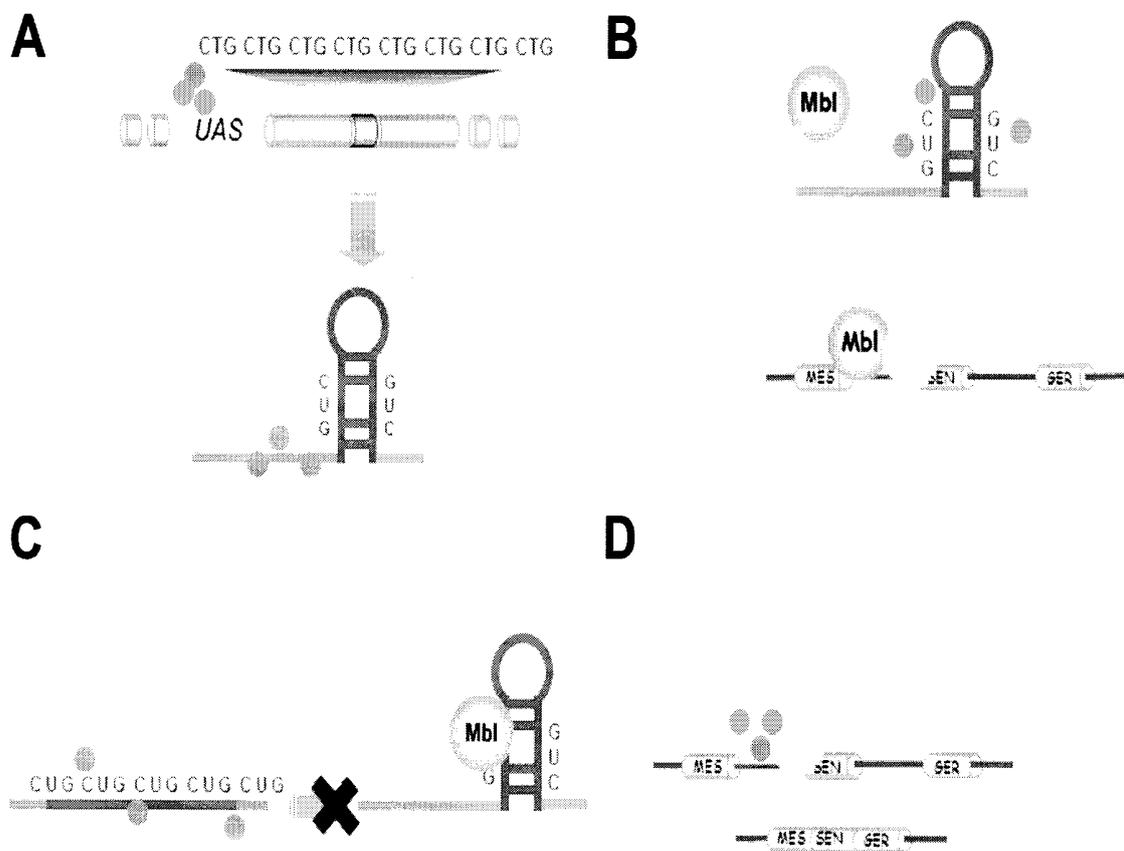


Figura 12



**Figura 13**

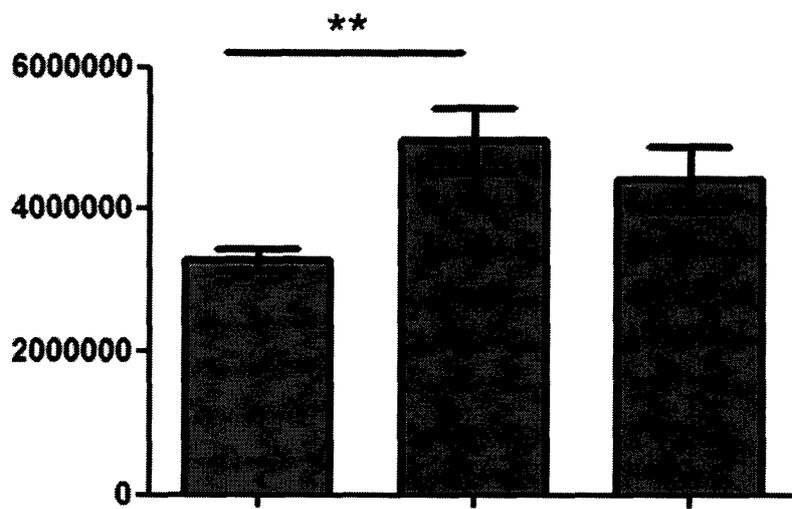


Figura 14

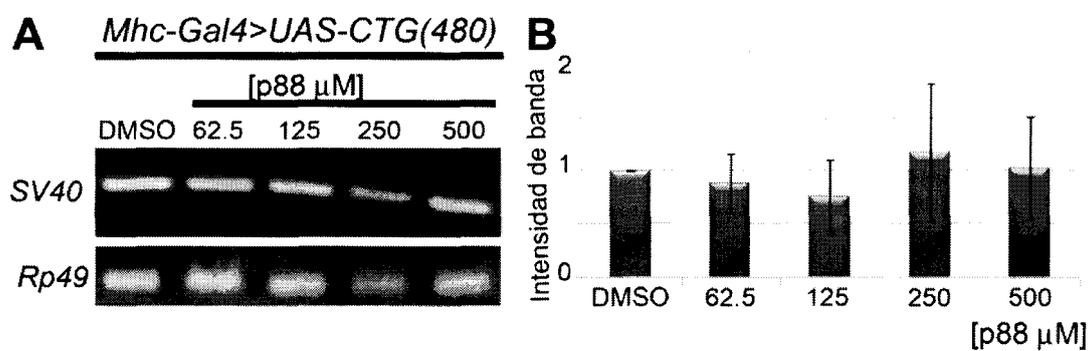


Figura 15

SRWLCLEVCREFORNKCSRQDTECKFAHPPANVEVQ  
SRWLCVEVCREFIRGQCARSDQECKFAHPPNVEVQ  
TKWLTLEVCREFORGTCSREDTECKFAHPSKSCQVE  
TKWLTLEVCREFORGTCSRSDAECKFAHPSKSCQVE  
TKWLTLEVCREFORGTCSREDTECKFAHPSKSCQVE  
TKWLTLEVCREFORGTCSRSDAECKFAHPPKSCQVE  
TKWLTLEVCREFORGTCSRADAECKFAHPPRVCHVE  
PPYAWE  
EWAYPP

Figura 16

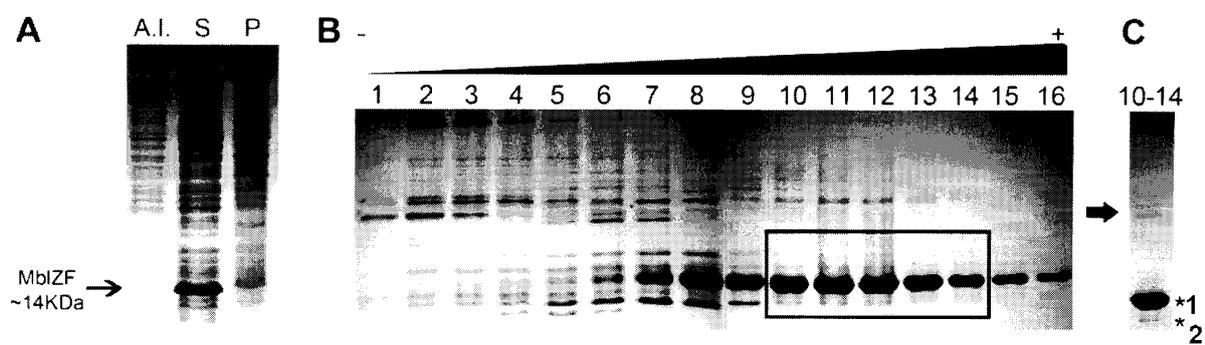


Figura17

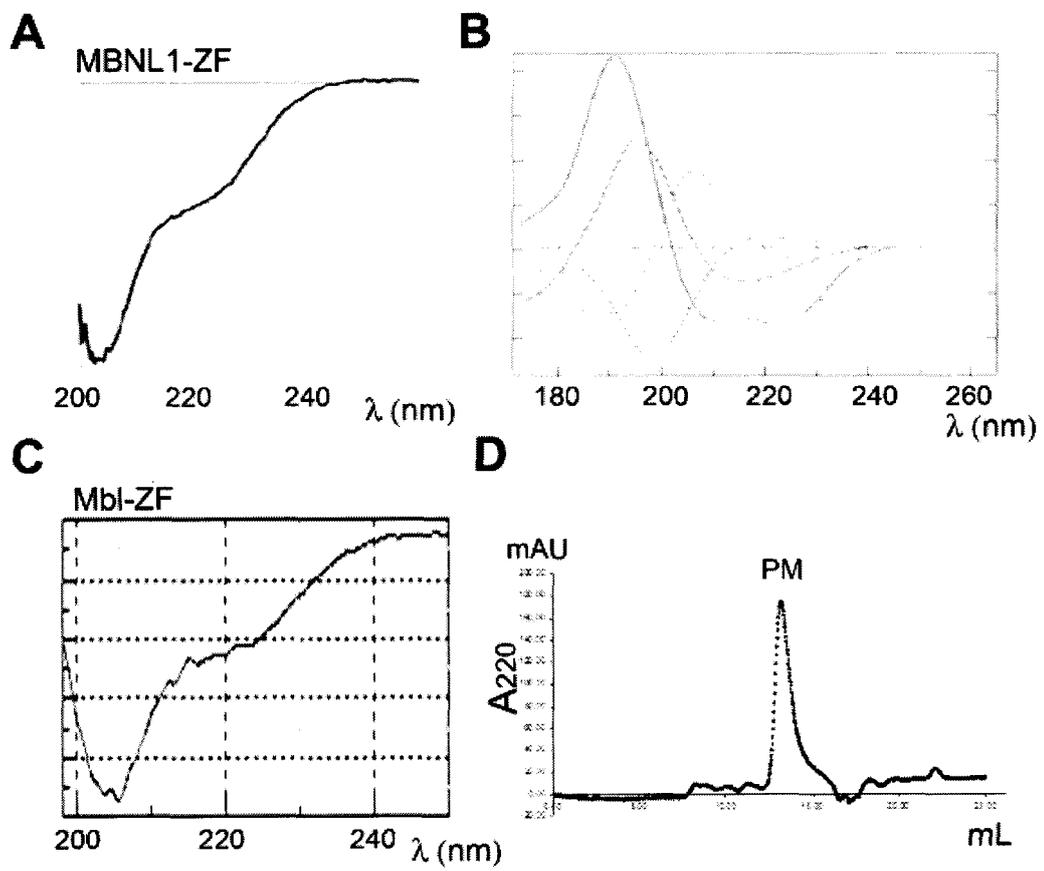


Figura 18

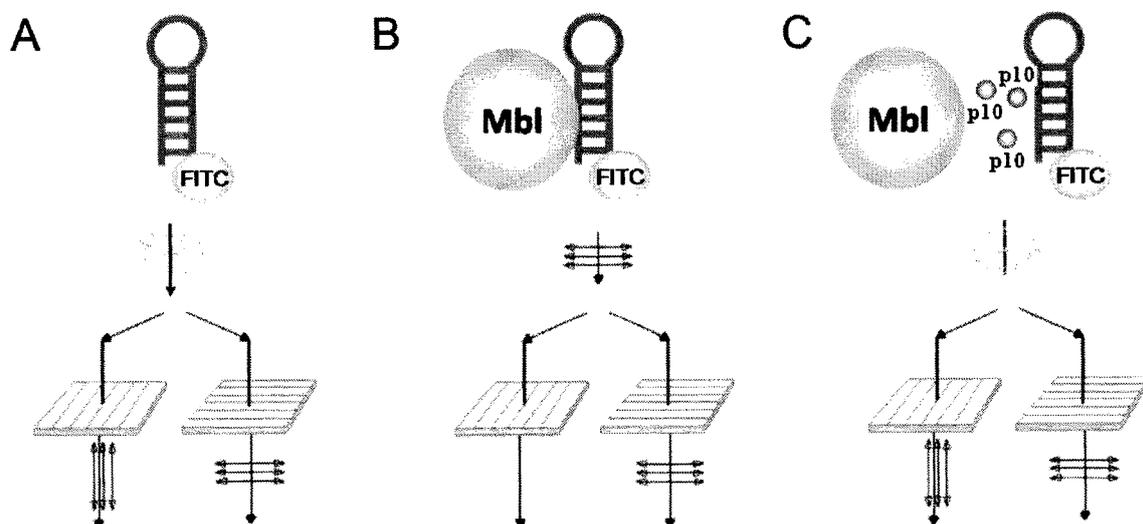
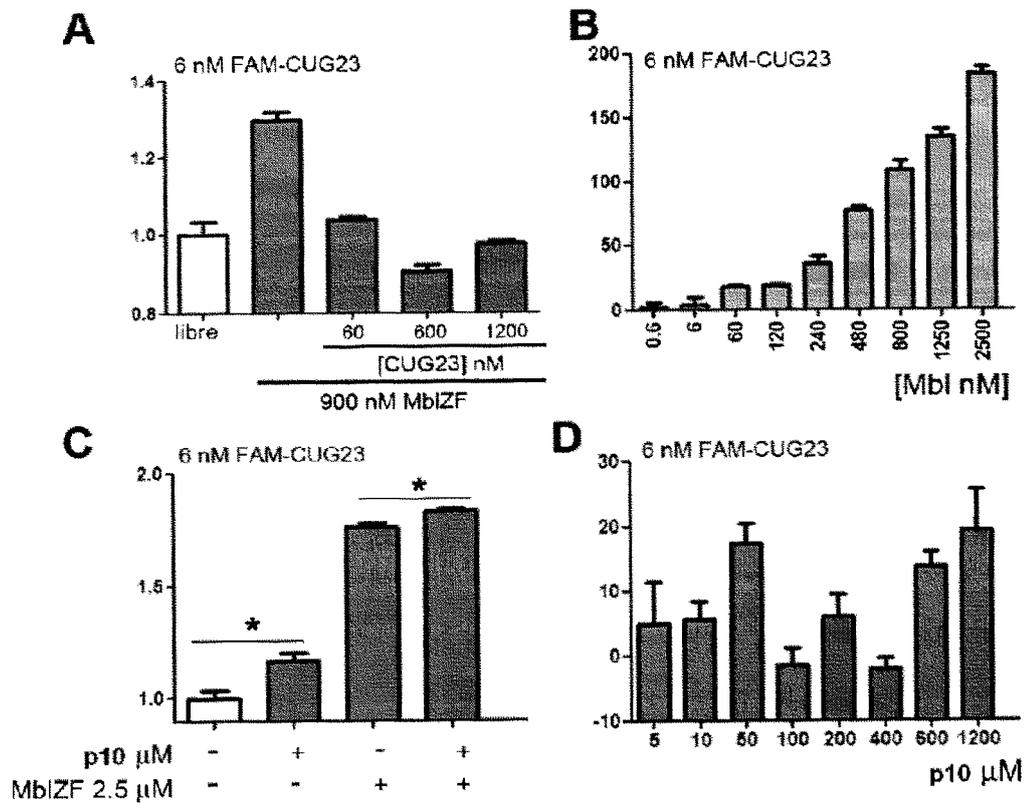


Figura 19



**Figura 20**

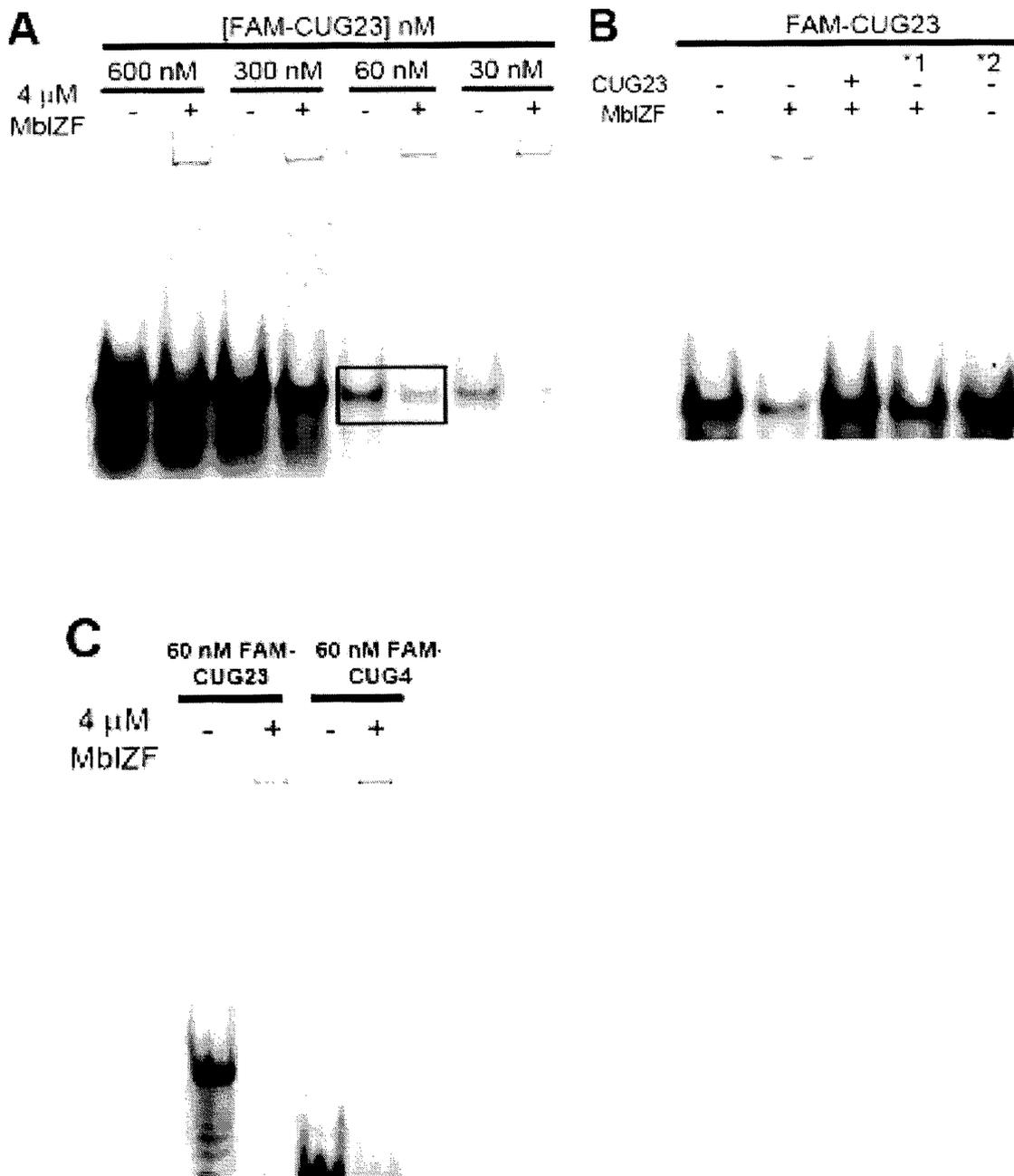
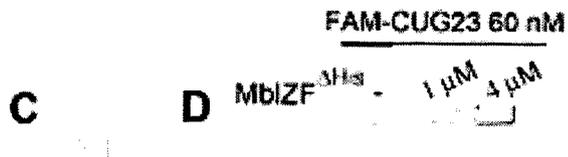
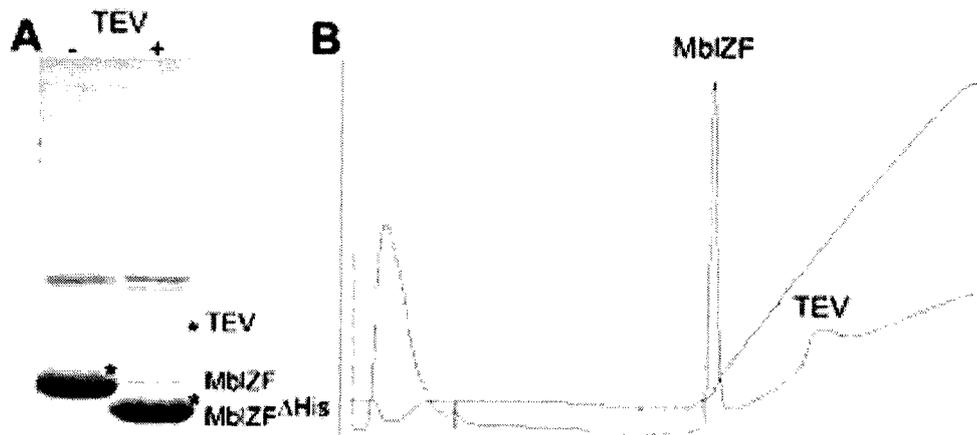
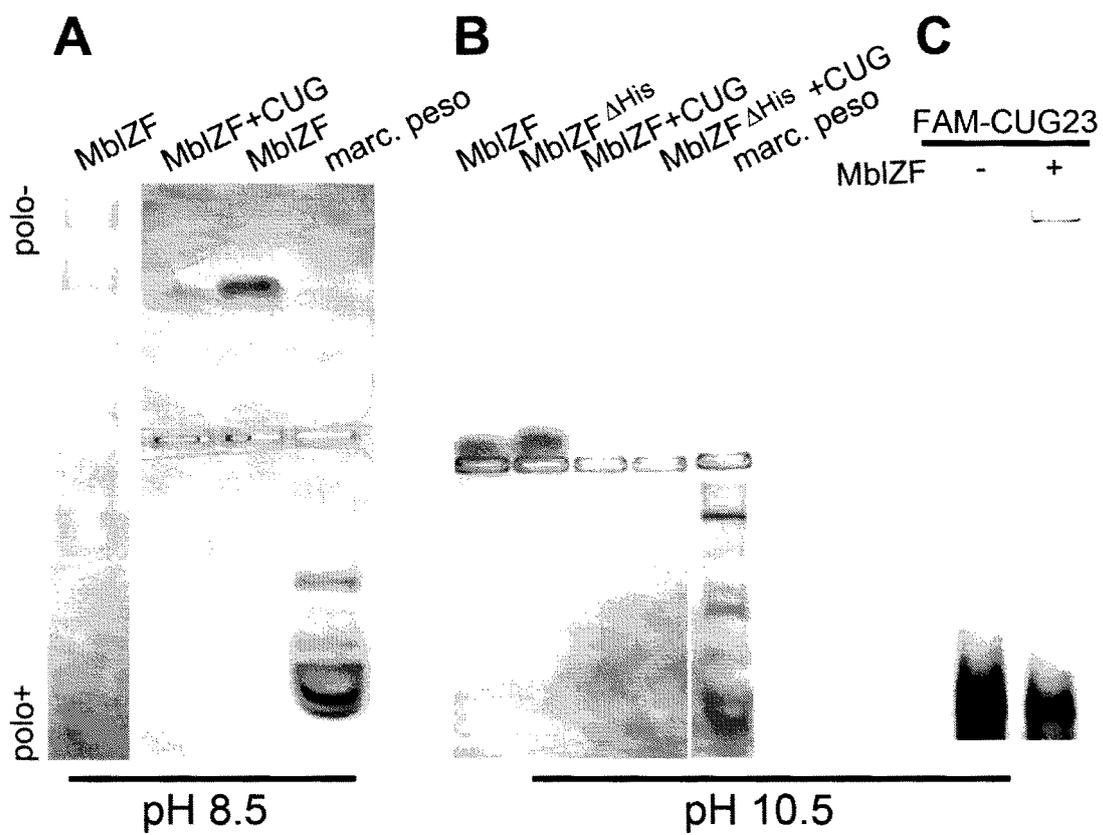


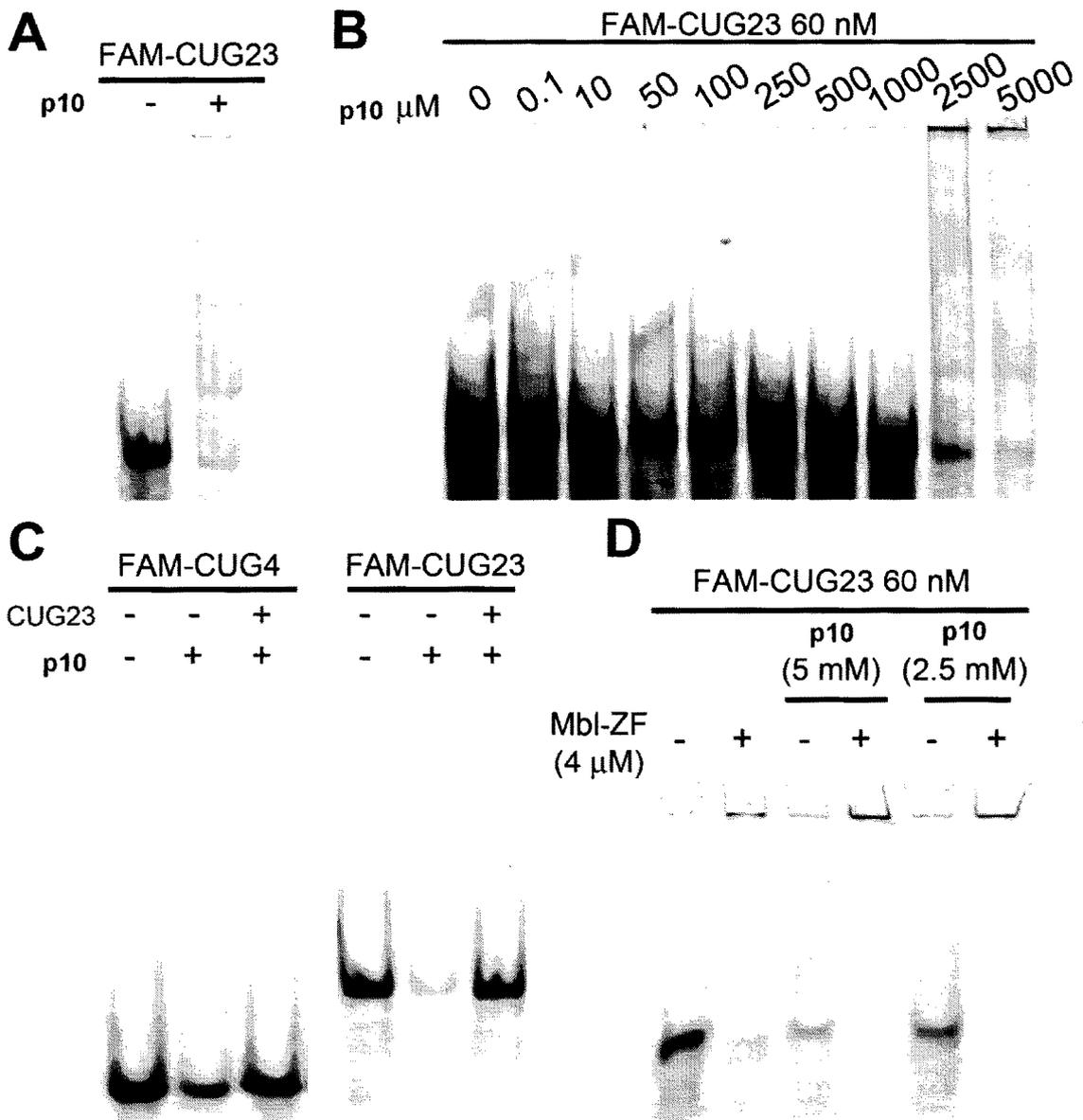
Figura 21



**Figura 22**



**Figura 23**



**Figura 24**

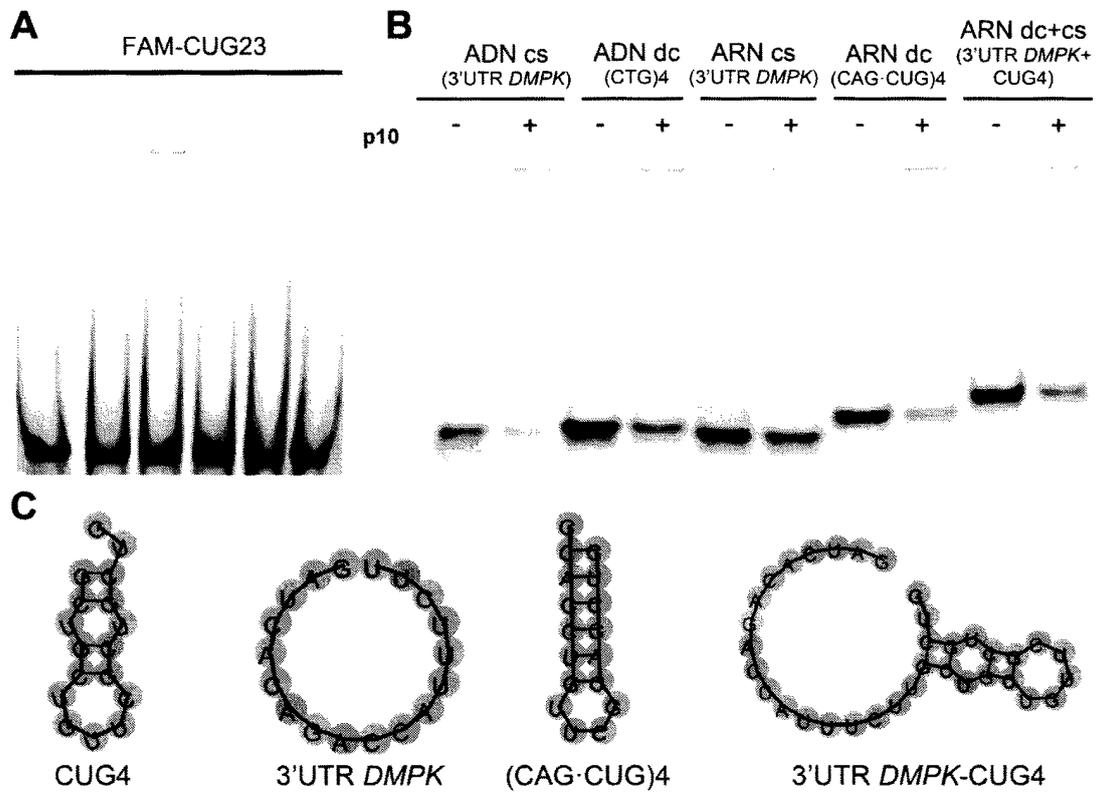
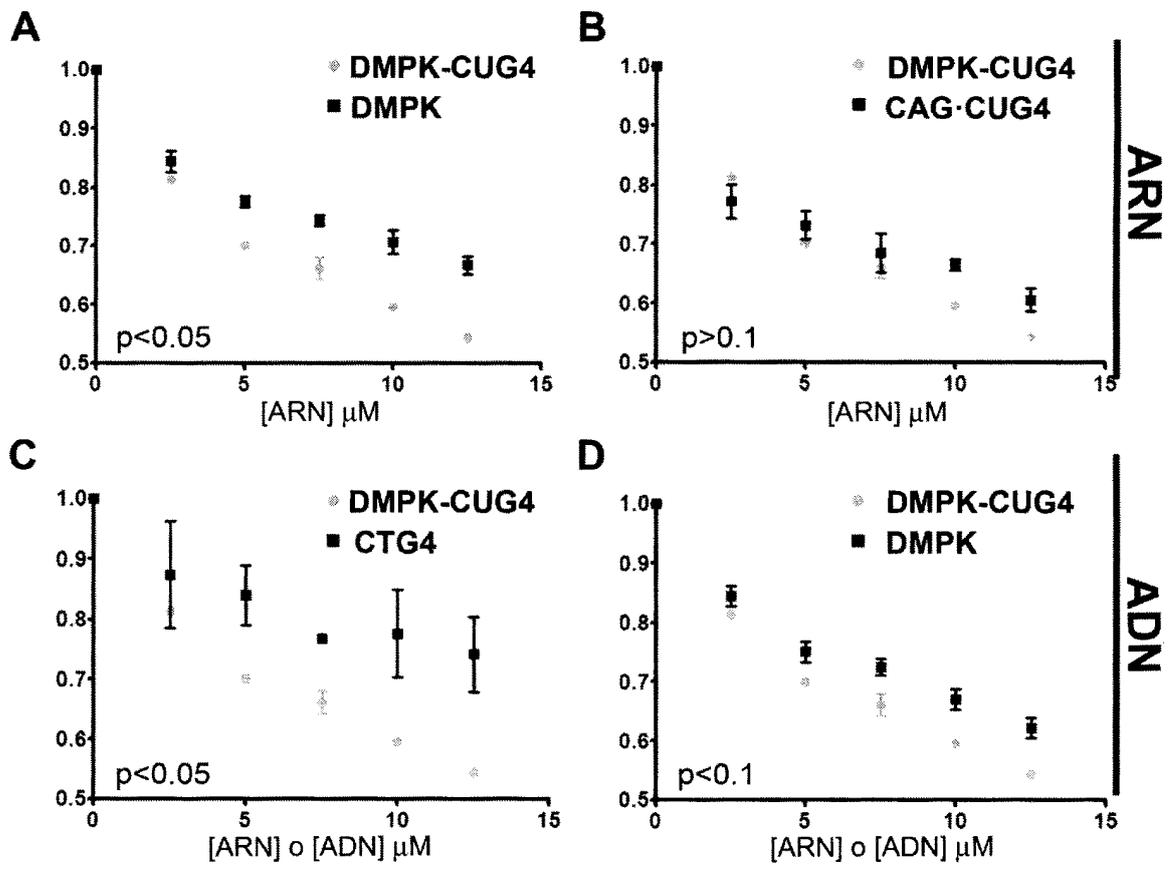


Figura 25



**Figura 26**

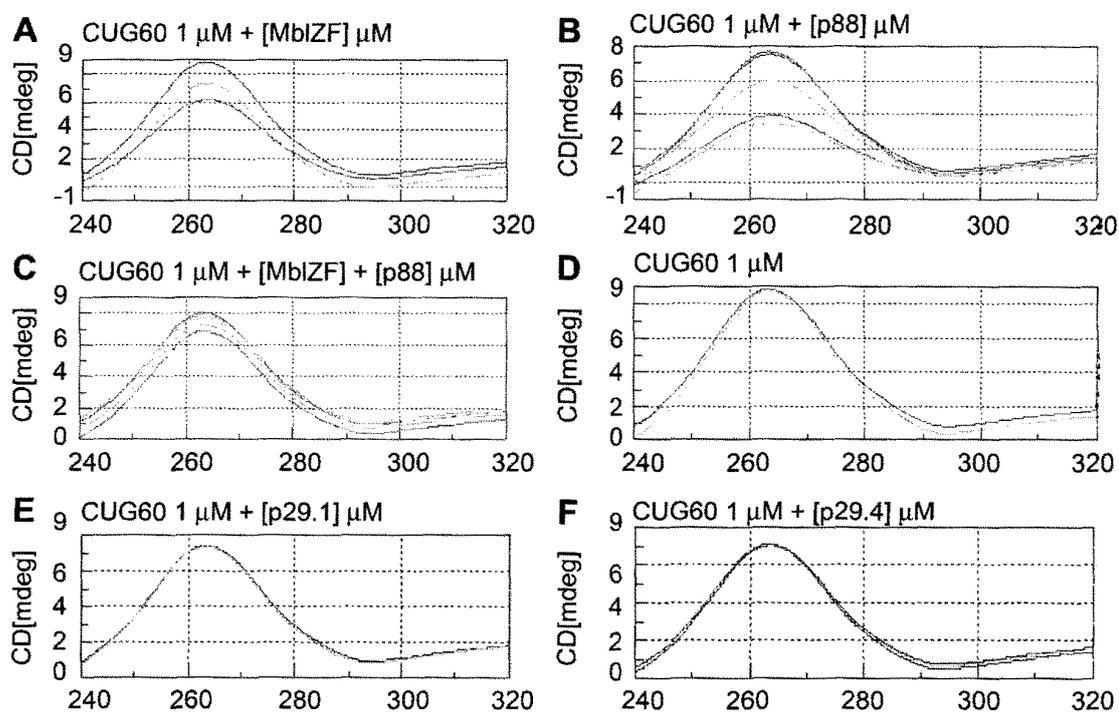
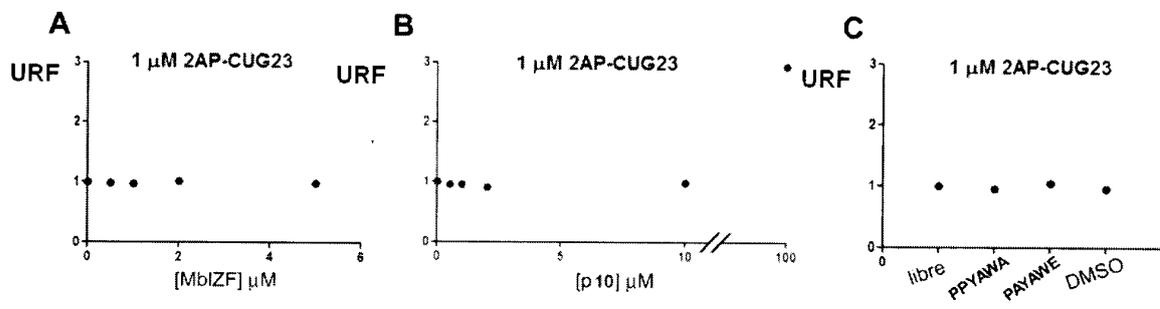


Figura 27



**Figura 28**

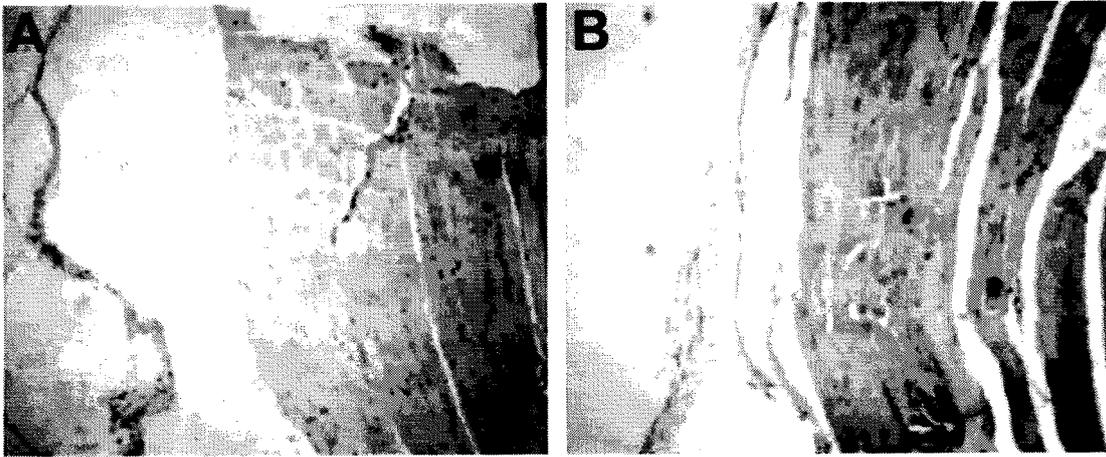
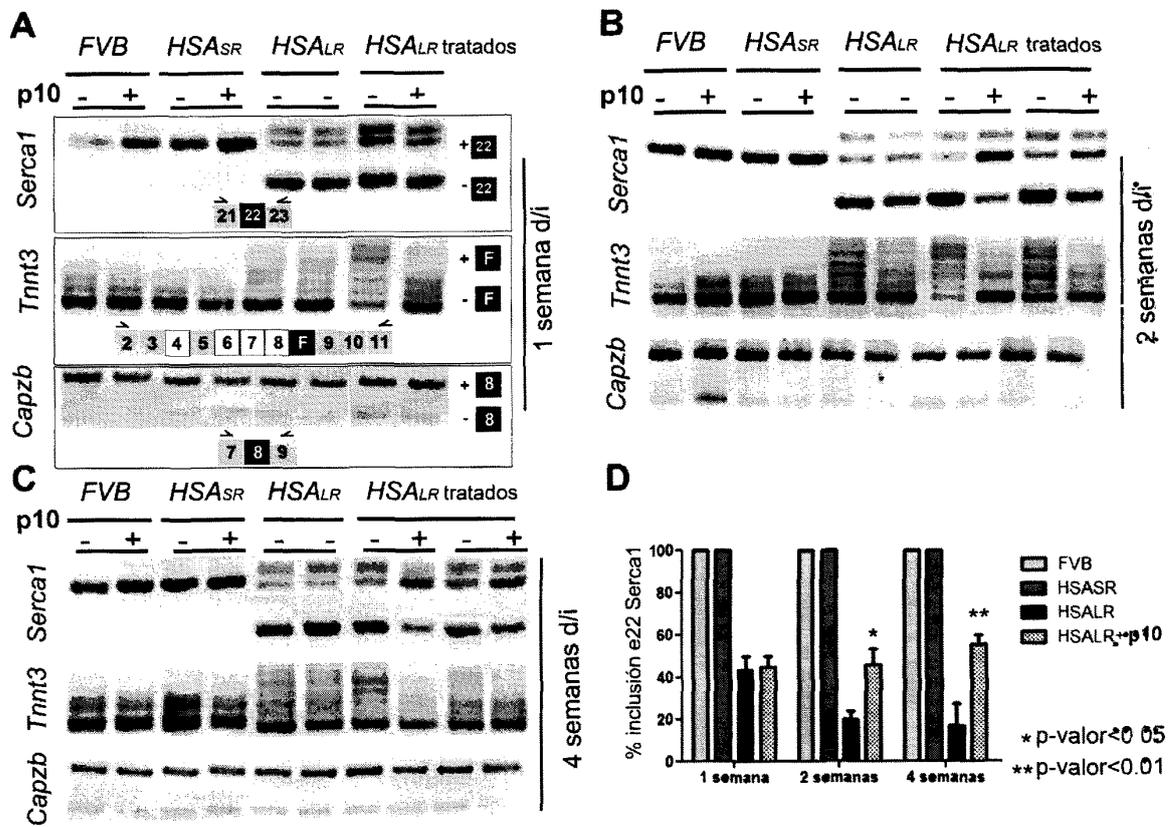
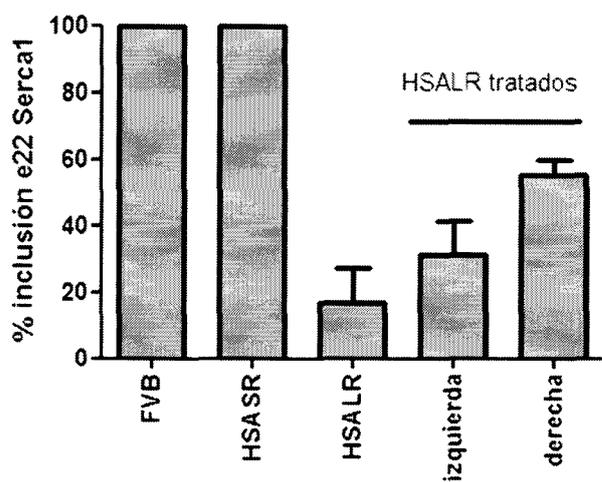


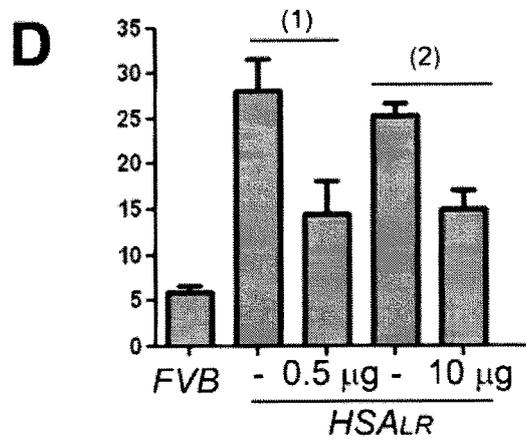
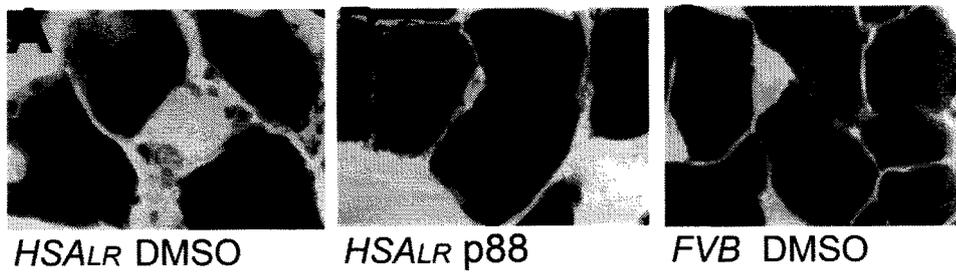
Figura 29



**Figura 30**



**Figura 31**



# ES 2 365 967 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> UNIVERSITAT DE VALENCIA  
5 FUNDACIÓN DE LA COMUNIDAD VALENCIANA CENTRO DE INVESTIGACIÓN PRÍNCIPE FELIPE  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS.
- <120> COMPUESTOS PARA SER USADOS EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES BASADAS EN LA  
10 EXPANSIÓN DE TRANSCRITOS TÓXICOS CON REPETICIONES CUG o CCUG.
- <130> P-03518
- <160> 19
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1  
20 <211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial
- 25 <220>  
<223> Hexapéptido 1 (p1)
- 30 <400> 1
- |  |     |     |     |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | Cys | Pro | Tyr | Ala | Gln | Glu |
|  | 1   |     |     |     | 5   |     |
- 35 <210> 2  
<211> 6  
<212> PRT  
40 <213> Artificial
- <220>  
<223> Hexapéptido 2 (p2)
- 45 <400> 2
- |  |     |     |     |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | Cys | Pro | Tyr | Ala | Trp | Glu |
|  | 1   |     |     |     | 5   |     |
- 50 <210> 3  
<211> 6  
<212> PRT  
55 <213> Artificial
- <220>  
60 <223> Hexapéptido 3 (p3)
- <400> 3
- 65 <210> 3  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial
- |  |     |     |     |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | Cys | Pro | Tyr | Thr | Gln | Glu |
|  | 1   |     |     |     | 5   |     |

## ES 2 365 967 A1

<210> 4  
<211> 6  
<212> PRT  
5 <213> Artificial  
  
<220>  
<223> Hexapéptido 4 (p4)  
10  
<400> 4  
  
Cys Pro Tyr Thr Trp Glu  
15 1 5  
  
<210> 5  
<211> 6  
20 <212> PRT  
<213> Artificial  
  
<220>  
25 <223> Hexapéptido 5 (p5)  
  
<400> 5  
  
Cys Gln Tyr Ala Gln Glu  
30 1 5  
  
35 <210> 6  
<211> 6  
<212> PRT  
40 <213> Artificial  
  
<220>  
<223> Hexapéptido 6 (p6)  
45  
<400> 6  
  
Cys Gln Tyr Ala Trp Glu  
50 1 5  
  
<210> 7  
<211> 6  
55 <212> PRT  
<213> Artificial  
  
<220>  
60 <223> Hexapéptido 7 (p7)  
  
<400> 7  
  
65  
Cys Gln Tyr Thr Gln Glu  
1 5

## ES 2 365 967 A1

<210> 8  
<211> 6  
<212> PRT  
5 <213> Artificial  
  
<220>  
<223> Hexapéptido 8 (p8)  
10  
<400> 8  
  
15 Cys Gln Tyr Thr Trp Glu  
1 5  
  
<210> 9  
<211> 6  
20 <212> PRT  
<213> Artificial  
  
<220>  
25 <223> Hexapéptido 9 (p9)  
  
<400> 9  
  
30 Pro Pro Tyr Ala Gln Glu  
1 5  
  
35 <210> 10  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial  
40  
  
<220>  
<223> Hexapéptido 10 (p10)  
45 <400> 10  
  
50 Pro Pro Tyr Ala Trp Glu  
1 5  
  
<210> 11  
<211> 6  
55 <212> PRT  
<213> Artificial  
  
<220>  
60 <223> Hexapéptido 11 (p11)  
  
<400> 11  
  
65 Pro Pro Tyr Thr Gln Glu  
1 5

## ES 2 365 967 A1

<210> 12  
<211> 6  
<212> PRT  
5 <213> Artificial  
  
<220>  
<223> Hexapéptido 12 (p12)  
10  
<400> 12  
  
Pro Pro Tyr Thr Trp Glu  
15 1 5  
  
<210> 13  
20 <211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial  
  
25 <220>  
<223> Hexapéptido 13 (p13)  
  
<400> 13  
30  
  
Pro Gln Tyr Ala Gln Glu  
1 5  
  
35 <210> 14  
<211> 6  
<212> PRT  
40 <213> Artificial  
  
<220>  
<223> Hexapéptido 14 (p14)  
45  
<400> 14  
  
Pro Gln Tyr Ala Trp Glu  
50 1 5  
  
<210> 15  
<211> 6  
55 <212> PRT  
<213> Artificial  
  
<220>  
60 <223> Hexapéptido 15 (p15)  
  
<400> 15  
65  
  
Pro Gln Tyr Thr Gln Glu  
1 5

## ES 2 365 967 A1

<210> 16  
<211> 6  
<212> PRT  
5 <213> Artificial

<220>  
<223> Hexapéptido 16 (p16)  
10  
<400> 16

15 Pro Gln Tyr Thr Trp Glu  
1 5

<210> 17  
<211> 10  
20 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
25 <223> Péptido 17 (p17)

<400> 17

30 Met Gly Gly Gly Pro Pro Tyr Ala Trp Glu  
1 5 10

<210> 18  
35 <211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial

40 <220>  
<223> Péptido 18 (p18)

45 <400> 18

Met Gly Gly Gly Glu Trp Ala Tyr Pro Pro  
1 5 10

50 <210> 19  
<211> 19  
<212> PRT  
55 <213> Artificial

<220>  
<223> Péptido 19 (p19)  
60  
<400> 19

65 Met Gly Gly Gly Pro Pro Tyr Ala Trp Glu Gly Gly Gly Glu Trp Ala Tyr Pro Pro  
1 5 10 15



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201030462

22 Fecha de presentación de la solicitud: 26.03.2010

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 2007027308 A1 (DUMAS et al. [FR]) 01.02.2007, resumen; párrafos 35,39,57-58,335; tabla III, página 132.	1,2,4-6,8
A	WO 2007121272 A2 (THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM [US]) 25.10.2007, resumen; página 3, líneas 2-9; página 7, línea 27 – página 8, línea 3; página 12, líneas 8-14,15-18.	1-8
A	WO 2009105691 A2 (STATE OF OREGON, UNIVERSITY OF OREGON) 27.08.2009, resumen; página 3, líneas13-26 – página 4, línea 3.	7
A	GARCÍA-LÓPEZ et al. "Genetic and chemical modifiers of a CUG toxicity model in Drosophila", 2008. PLoS ONE 3(2): e1595. Recuperado de Internet el 24.02.2011: <URL: <a href="http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0001595">http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0001595</a> > <DOI: 10.1371/journal.pone.0001595>, todo el documento.	7
A	KANADIA et al. "Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy". PNAS. 2006. Vol. 103(31), páginas 11748-11753, todo el documento.	7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
05.07.2011

Examinador  
M. García Grávalos

Página  
1/5

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K38/08** (2006.01)

**C07K7/06** (2006.01)

**A61P25/14** (2006.01)

**A61P21/00** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, C07K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, NPL, XPESP, EMBASE, BIOSIS, GOOGLE SCHOLAR, GOOGLE PATENTS, USPTO PATENT DATABASE, STN, EBI, ExPASy.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 05.07.2011

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 3, 7	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1, 2, 4-6, 8	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 3, 7	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1, 2, 4-6, 8	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 2007027308 A1	01.02.2007
D02	WO 2007121272 A2	25.10.2007
D03	WO2009105691 A2	27.08.2009
D04	GARCÍA-LÓPEZ et al. PLoS ONE 2008. Vol. 3(2): e1595. <DOI: 10.1371/journal.pone.0001595>.	2008
D05	KANADIA et al. PNAS. 2006. Vol. 103(31), páginas 11748-11753.	2006

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud divulga hexapéptidos y derivados de los mismos con utilidad en la preparación de medicamentos para el tratamiento de enfermedades genéticas en las que se producen transcritos tóxicos con repeticiones CUG ó CCUG y, en particular de las distrofias miotónicas tipos 1 y 2 (DM1, DM2) y de la ataxia espinocerebelar de tipo 8 (SCA8).

El documento D01 se refiere a péptidos lineales de longitud variable constituidos por L-aminoácidos naturales que se obtienen a partir de ARN mensajero que codifica para proteínas de secreción. Asimismo, divulga el empleo de dichos péptidos en composiciones farmacéuticas con diversos usos terapéuticos (ver resumen; párrafos 35, 39, 57-58, 335; tabla III, página 132).

El documento D02 divulga composiciones útiles para el tratamiento de patologías, tales como la DM1, que tienen su origen en la existencia de repeticiones nucleotídicas expandidas en ciertos genes. En particular, las citadas composiciones comprenden péptidos de longitud variable capaces de evitar o romper la asociación entre ARN que contiene las repeticiones nucleotídicas y proteínas como la esqueletrofina (ver resumen; página 3, líneas 2-9; página 7, línea 27-página 8, línea 3; página 12, líneas 8-14, 15-18).

El documento D03 hace referencia a compuestos capaces de unirse a regiones con repeticiones nucleotídicas, los cuales son de utilidad para el tratamiento de la distrofia miotónica. En concreto, divulga el uso de compuestos no peptídicos como la pentamidina, heptamidina y derivados (ver resumen; página 3, líneas 13-26-página 4, línea 3).

El documento D04 divulga el uso de compuestos no peptídicos capaces de modificar fenotipos patológicos en un modelo de DM1 en *Drosophila* en el que las moscas expresan ARNs con repeticiones CUG (ver todo el documento).

El documento D05 divulga el uso de vectores adenovirales para la sobreexpresión de la proteína *muscleblind-like1* (MBNL1) en el músculo esquelético, siendo dicha sobreexpresión capaz de revertir la hiperexcitabilidad muscular en un modelo de distrofia miotónica en ratones (ver todo el documento).

**1. NOVEDAD (Art. 6.1 LP 11/1986).****1.1. Reivindicaciones 1-8.**

El documento D01 se considera el más cercano al estado de la técnica, ya que anticipa un polipéptido constituido por 101 L-aminoácidos naturales que contiene el hexapéptido: PQYAWE. Asimismo, D01 se refiere a fragmentos de más de cinco aminoácidos de dicho polipéptido. Por otra parte, D01 anticipa el uso de los péptidos anteriores como principios activos en composiciones farmacéuticas para el tratamiento de diversas patologías humanas, incluidas enfermedades de origen genético.

Teniendo en cuenta lo anterior, D01 abarca compuestos con las mismas características que algunos de los compuestos reivindicados en la presente solicitud. En particular, anticipa péptidos que comprenden o consisten en PQYAWE (SEQ ID NO: 14), y que poseerían, a la luz de lo divulgado en la solicitud, una naturaleza adecuada para obtener la solución al problema técnico planteado. Por el contrario, D01 no anticipa el objeto de la reivindicación 7 de la presente solicitud, tal es el uso de los péptidos de la invención para preparar composiciones farmacéuticas útiles para el tratamiento de DM1, DM2 ó SCA8, las cuales tienen como base la presencia de transcritos con repeticiones CUG ó CCUG. Asimismo, D01 tampoco incluye un compuesto consistente en el hexapéptido de SEQ ID NO: 10 de la reivindicación 3.

En consecuencia, se considera que D01 anticipa de forma idéntica el objeto de las reivindicaciones 1-2, 4-6 y 8 y, por lo tanto, dichas reivindicaciones, tal y como han sido redactadas en la presente solicitud, no cumplirían con el requisito de novedad (Art. 6.1 LP 11/1986).

Las reivindicaciones 3 y 7 sí cumplen con el requisito de novedad (Art. 6.1 LP 11/1986).

## 2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP 11/1986)

### 2.1. REIVINDICACIONES 3 y 7.

El documento D01 se refiere a fragmentos de proteínas de secreción de los que pueden obtenerse péptidos señal. De acuerdo con los inventores de D01, dichos péptidos pueden ser de utilidad médica en diversas áreas terapéuticas cuando se emplean solos o conjugados con otros compuestos. Sin embargo, ninguna de las posibles aplicaciones médicas de los péptidos de D01 presenta relación alguna con el tratamiento o prevención de DM1, DM2 ó SCA8, o de otras enfermedades que tengan como base la producción de transcritos tóxicos con repeticiones nucleotídicas.

Adicionalmente, cabe destacar que el documento D02 anticipa compuestos peptídicos, entre los que se incluyen hexapéptidos, que tienen como función interferir en la acción secuestradora por parte de los transcritos tóxicos de proteínas relevantes en la DM1. Sin embargo, dichos péptidos, aunque poseerían una función análoga a la de los compuestos de la invención, son distintos en su composición química. Además, a partir de las enseñanzas del estado de la técnica y del contenido de la descripción de la invención objeto de la presente solicitud, puede concluirse que el péptido de SEQ ID NO: 10, definido en la reivindicación 3, es consecuencia de las investigaciones llevadas a cabo por los inventores y, en modo alguno, su composición y utilidad en el tratamiento de DM1, DM2 ó SCA8 hubieran resultado evidentes para un experto en la materia a partir del conocimiento del estado de la técnica pertinente.

En base a lo expuesto, el objeto de la presente solicitud, tal y como se define en las reivindicaciones 3 y 7, cumpliría el requisito de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).