

DESARROLLO DE UNA TERAPIA INNOVADORA CONTRA LA DISTROFIA MIOTÓNICA



La distrofia miotónica (DM) es una enfermedad genética rara que no tiene tratamiento. Afecta sobre todo a sistema nervioso, músculo y corazón. Por su prevalencia y la gravedad de los síntomas, encontrar una cura para la DM es una necesidad social. / Myotonic dystrophy (DM) is a rare genetic disease that has no treatment. It affects mainly nervous system, muscle and heart. Because of its prevalence and the severity of the symptoms, finding a cure for DM is a social necessity.

✓ OBJETIVO

Mínimo: 3.000 €
Óptimo: 25.000 €

✓ UBICACIÓN

Valencia





Descripción

Cerro-Herreros E, Sabater-Arcis M, Fernandez-Costa JM, Moreno N, Perez-Alonso M, Llamusi B, Artero R. [miR-23b and miR-218 silencing increase Muscleblind-like expression and alleviate myotonic dystrophy phenotypes in mammalian models](#). Nat Commun. 2018 Jun 26;9(1):2482. doi: 10.1038/s41467-018-04892-4.



¿Qué está ocurriendo?

La **distrofia miotónica (DM)** es una enfermedad genética degenerativa que se considera rara porque afecta a 1/8000 nacidos, y es la atrofia muscular más común en adultos. Dado que la odisea diagnóstica puede tardar hasta 14 años en algunos casos, es probable que los casos que se diagnostiquen sean sólo la punta del iceberg. Aunque es una enfermedad multisistémica, afecta sobre todo a sistema nervioso, músculo y corazón. Los pacientes sufren atrofia, miotonía y debilidad muscular. Hoy en día, el manejo de los síntomas es la única forma de preservar la calidad de vida de las personas que viven con esta enfermedad. En su forma más común (DM1), la aparición de síntomas ocurre durante la adolescencia y las personas afectadas tienen una vida útil significativamente más corta de 48-55 años, lo que significa que los pacientes combaten las manifestaciones de la enfermedad durante décadas, requiriendo asistencia de un grupo de profesionales de la salud incluyendo médicos, fisioterapeutas, terapeutas ocupacionales y logopedas. Por su prevalencia y la gravedad de los síntomas del paciente, encontrar una cura para la DM es una necesidad social.



¿Por qué?

Esta enfermedad se origina a partir de una expansión de trinucleótidos CTG en la región 3'UTR del gen DMPK que, tras su transcripción, forma horquillas CUG que se consideran tóxicas porque secuestran proteínas muy importantes durante el desarrollo, como las proteínas MBNL, que son reguladoras del splicing alternativo mecanismo molecular de edición post-transcripcional mediante el cual se obtienen varios mARN (ARN mensajero, aquel que será traducido a proteínas) a partir de una única secuencia de ADN que ha sido transcrito a un transcrito primario de mARN. La falta de MBNL provoca alteraciones en el metabolismo del RNA que originan los síntomas de la enfermedad. Los estudios en modelos animales han demostrado que el aumento de MBNL revierte la enfermedad y su sobreexpresión es



bien tolerada. Por este motivo, los esfuerzos de nuestro grupo se han centrado en desarrollar una estrategia terapéutica que permita aumentar los niveles de MBNL en los pacientes de DM.

Además, de ser efectiva, este tipo de terapias podrían diseñarse frente a otras enfermedades en las que se ha visto que la falta de función de MBNL esté implicada en la patogenia, tales como SCA8, ELA, hepatocarcinoma etc....



¿Y ahora qué podemos hacer?

Unas de las estrategias más innovadoras y exitosas para modular la expresión génica son las terapias basadas en miRNAs. Los miRNAs son moléculas de 20-23 nucleótidos implicadas en la regulación de más del 70% de los transcritos humanos. La actividad de los miRNAs puede ser inhibida por oligonucleótidos antisentido con secuencia complementaria total o parcial a un miRNA (llamados antimiRs). Nuestro grupo ha descubierto que la expresión de MBNL en condiciones normales está reprimida por ciertos microRNAs y que la inhibición de dichos microRNAs por moléculas antisentido puede ser terapéutica, ya que permite un aumento de la expresión de MBNL que rescata fenotipos característicos de DM en modelos de la enfermedad.

Las pruebas de concepto que hemos generado para validar esta estrategia terapéutica son las siguientes: i) En un modelo en *Drosophila* de DM1 en el que la expresión de expansiones CTG origina atrofia y defectos locomotores, la expresión transgénica de antimiRs, rescata estos fenotipos (*Cerro-Herreros et al., 2016, Scientific Reports*). ii) En células humanas, identificamos dos miRNAs (miR-23b y miR-218) que reprimen la expresión de MBNL. Estos microRNAs están muy conservados entre ratón y humano y se expresan en músculo humano y de ratón. iii) Tanto en mioblastos DM1 como en un modelo murino de DM1, el tratamiento con antimiRs en el medio o por administración subcutánea, respectivamente, aumentó la expresión de MBNL y rescató defectos moleculares, histopatológicos y funcionales que eran consecuencia de la falta de función de esta proteína. Estos datos, nos animan a proponer este tipo de moléculas antimiRs como terapia eficaz contra DM y a implicarnos en su desarrollo.



PRECIPITANDO ¿A qué se dedicará tu aportación?

Nuestro objetivo es desarrollar una terapia contra la Distrofia Miotónica. Para ello, proponemos evaluar la eficacia terapéutica de antagomiRs reguladores de MBNL, en un modelo murino de la enfermedad. Para ello, llevaremos a cabo los siguientes objetivos específicos:



- Si logramos alcanzar el objetivo mínimo, realizaremos un estudio de dosis-respuesta en el modelo en ratón de la enfermedad. Para ello, los oligonucleótidos antagomiR-23b y antagomiR-218 se administrarán por separado por vía subcutánea en tres dosis a seis ratones HSA[LR] cada uno (machos de 5 meses de edad) por dosis. Servirán como control un grupo de seis ratones HSA[LR] que recibirán vehículo solo (PBS) y cinco ratones normales (cepa FVB, background genético de HSA[LR]) de la misma edad y sexo. Las tres dosis estarán entre un rango mínimo de 1 mg/kg y máximo de 50 mg/kg. Los tratamientos se analizarán a los 4 días post-inyección e incluirán: (1) realizar medidas de mionía (inserciones de electrodo según descrito en Kanadia et al. 2006) y fuerza muscular al inicio y final del tratamiento; (2) obtención de muestras de músculo esquelético (qd, cuádriceps; gt, gastrocnemius), para extracción de miRNA, RNA total y proteínas y para el procesado histológico. Comprobaremos el silenciamiento de sus miRNA diana en musculatura esquelética (RT-qPCR para miRNAs) y los niveles de MBNL1 y MBNL2 a nivel de transcrito (RT-qPCR) y proteína (ELISA). Seguidamente evaluaremos el rescate de alteraciones en el splicing alternativo de transcritos musculares mediante RT-PCR semicuantitativa y cuantificaremos el porcentaje de núcleos centrales en ratones control y tratados en secciones musculares teñidas con hematoxilina-eosina. El conjunto de estos datos permitirá concluir si hay correlación entre dosis y mejora de fenotipos musculares, así como sugerir una dosis óptima (aquella a la que mayor rescate observamos) y una dosis mínima a la que se observa mejora de fenotipos (MED, minimum effective dose).

- En el caso de alcanzar el importe óptimo, realizaremos estudios de dosis múltiples, así como de toxicidad y activación del sistema inmune. Tras determinar la dosis óptima, para estudiar la duración de la actividad ejercida por los antagomiRs, administraremos dicha dosis (que puede ser diferente para cada antagomiR), también por vía subcutánea, a un grupo de 20 ratones que iremos sacrificando sucesivamente a los 15, 30, 60 y 90 días post-inyección (5 animales por punto temporal). Las determinaciones que se realizarán después del sacrificio serán las explicadas en el objetivo anterior y los resultados nos permitirán determinar cuánto tiempo post-inyección se mantiene el efecto de los compuestos. Para estudiar la toxicidad del tratamiento en los ratones, se obtendrá sangre total al sacrificar a los animales en todos los tratamientos anteriores y se evaluarán marcadores de toxicidad hepática (FA, GGT, GPT), renal (ácidos biliares, urea, creatinina) y muscular (CPK) y se realizará una necropsia visual del aspecto y tamaño de los principales órganos. La evaluación el estado de activación del sistema inmunitario se realizará mediante medidas de citoquinas inflamatorias con kits ELISA comerciales. Las medidas de interleuquinas (IL)1beta e IL6 y Toll-like receptor (TLR)3 y TLR7 nos darán una idea de la respuesta innata mientras que IL12 e IL10 lo harán de la respuesta adaptativa.

Por último, si conseguimos superar el objetivo óptimo, realizaremos un



estudio del efecto de nuestros antagomiRs en mioblastos DM1, para comprobar que los resultados obtenidos se corroboran en este modelo de la enfermedad. En este caso se administrarán los antimiRs en el medio celular y posteriormente se realizará un estudio de toxicidad y de los cambios de expresión de MBNL1 y MBNL2 mediante RT-PCR (transcrito) y ELISA (proteína). Estos datos nos permitirán apoyar los resultados previos y poder contactar con alguna farmacéutica que se encargue de continuar con la fase clínica del tratamiento.



¿Quieres saber más?

En las siguientes direcciones web podrás encontrar más información sobre la enfermedad, los oligonucleótidos terapéuticos y sobre nuestro laboratorio, respectivamente.

Myotonic Dystrophy Foundation (<https://www.myotonic.org/>)

Muscular Dystrophy Association (<https://www.mda.org/>)

Federación Española de Enfermedades Neuromusculares (<http://www.asem-esp.org/>)

Federación Española de Enfermedades Raras (<https://enfermedades-raras.org/>)

Oligonucleotide Therapeutics Society (<https://oligotherapeutics.org>)

Artero's lab Translational Genomics (<https://www.uv.es/gt/>)



Repercusiones del proyecto

La distrofia miotónica es una enfermedad progresiva, para la que hoy en día solo se ha conseguido mejorar la calidad de vida de los pacientes atenuando los síntomas que muestran. Aunque la esperanza de vida de los individuos con DM se reduce, los pacientes luchan contra las manifestaciones de la enfermedad durante décadas, requiriendo la asistencia de un grupo de profesionales de la salud, incluyendo médicos, fisioterapeutas, terapeutas ocupacionales y fonoaudiólogos. Es importante destacar que, aunque se clasifica como rara, la DM es la atrofia muscular más común en adultos y es una enfermedad altamente discapacitante, ya que los síntomas reportados como la somnolencia diurna excesiva y la debilidad muscular son una barrera para la plena participación en el trabajo, la escuela o la vida social. Algunos pacientes padecen bajadas del estado de ánimo que



pueden deberse a cambios en el cerebro relacionados con DM. Por otra parte, la mayoría de los individuos son diagnosticados entre los 30 y 50 años de edad, lo que significa que los pacientes son población activa y su rendimiento en el trabajo, o las opciones para encontrar un nuevo trabajo pueden verse reducidos en gran medida por la enfermedad. Nuestro proyecto supondría un tratamiento que no sólo evitaría el inicio de los síntomas de la enfermedad, sino que también permitiría tratar a individuos adultos, mejorando así de forma notable su calidad y esperanza de vida, así como la de todo su entorno. Además, esta terapia supondría el inicio de investigaciones para otras enfermedades cuya base genética sea similar, basadas en este tipo de compuestos, como ya es el caso de Spinraza como tratamiento para la atrofia muscular espinal.



Otros datos

1. Overby SJ, Cerro-Herreros E, Llamusi B, Artero R. [RNA-mediated therapies in myotonic dystrophy](#). Drug Discov Today. 2018 Aug 4. pii: S1359-6446(17)30530-5. doi: 10.1016/j.drudis.2018.08.004. [Epub ahead of print] Review
2. Cerro-Herreros E, Sabater-Arcis M, Fernandez-Costa JM, Moreno N, Perez-Alonso M, Llamusi B, Artero R. [miR-23b and miR-218 silencing increase Muscleblind-like expression and alleviate myotonic dystrophy phenotypes in mammalian models](#). Nat Commun. 2018 Jun 26;9(1):2482. doi: 10.1038/s41467-018-04892-4.
3. Konieczny P, Selma-Soriano E, Rapisarda AS, Fernandez-Costa JM, Perez-Alonso M, Artero R. [Myotonic dystrophy: candidate small molecule therapeutics](#). Drug Discov Today. 2017 Nov; 22(11):1740-1748. doi: 10.1016/j.drudis.2017.07.011. Epub 2017 Aug 2. Review.
4. Cerro-Herreros E, Fernández-Costa JM, Sabater-Arcis M, Llamusi B, Artero R. (2016). Derepressing muscleblind expression by miRNA sponges ameliorates myotonic dystrophy-like phenotypes in Drosophila. *Sci Rep*. 6:36230. A. IF (2015): 5.228. 7/63 Multidisciplinary Sciences.

Patentes:

Inventores/as: Rubén Artero; Beatriz Llamusi; Estefanía Cerro Herreros; Juan M. Fernández Costa

Título: Modulación de microRNAs contra la distrofia miotónica tipo 1 y antagonistas de microRNAs para ello

Núm. de Solicitud: P201631216 País de prioridad: España. Fecha de prioridad: 19/09/2016

Entidad Titular: Universidad de Valencia

Actualmente estamos colaborando con empresas internacionales del ámbito de los oligonucleótidos terapéuticos, pero debido a acuerdos de



confidencialidad, estas no pueden indicarse.



Ubicación

Puedes encontrarnos en el edificio B de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia, situado en el campus de Burjasot.



¿Quién está detrás de este proyecto?

La Dra. M. Beatriz Llamusi ha centrado su carrera científica en el estudio de las bases moleculares de la patogénesis y los posibles tratamientos mediante la generación de modelos animales de enfermedades humanas. Tras realizar su doctorado en la Universidad Miguel Hernández, su enfoque se movió de la neuroregeneración en la médula espinal a enfermedades raras, específicamente distrofia miotónica (DM), trabajando bajo la supervisión del Prof. Dr. Artero, en el laboratorio de Genética Traslacional (GT) afiliada a la Universidad de Valencia (UV) y el instituto de investigación en salud INCLIVA. Ha contribuido con 21 artículos científicos en revistas indexadas, que incluyen investigaciones y revisiones originales sobre el estado de la investigación en DM. Su interés actual en la investigación es comprender la neurodegeneración de la DM, la disfunción cardíaca y la atrofia muscular, investigar sus bases moleculares y encontrar fármacos que supriman estos fenotipos. Como investigador principal, le han sido adjudicados cuatro proyectos. Uno de ellos, fundado por RTVE telemaratón, permitió el desarrollo de un compuesto activo contra DM que había sido descubierto anteriormente. En la segunda investigación (programa europeo E-rare), reunió una experiencia bastante única en el estudio del corazón de *Drosophila*, describiendo con éxito la disfunción cardíaca en la DM tipo 1 y 2, y los efectos de diferentes modificadores químicos y genéticos. En 2017, el Instituto de Investigación Carlos III le otorgó un proyecto de investigación en Salud como Co-IP (PI17 / 00352), centrado en la modulación genética de la expresión de MBNL con inhibidores de microRNAs, como un nuevo enfoque terapéutico para la DM. Para el desarrollo de estos inhibidores, que anteriormente su grupo había protegido por una patente, como terapia contra la DM, ha dirigido un proyecto de valorización del programa Caixaimpulse, que incluía formación y mentorización especializada, además de ayuda financiera y ha obtenido financiación para estudios de viabilidad por parte de FIPSE. Su motivación es la traslación de su investigación para beneficiar a la sociedad y, como tal, ha descubierto cinco compuestos anti-DM1, que están protegidos por patentes y alguno de los cuales ha sido licenciado por empresas de biotecnología. Ha participado en múltiples colaboraciones de investigación publicadas con grupos clínicos o de investigación



nacionales o internacionales, y también en colaboraciones con empresas de biotecnología para obtener licencias de patentes, acuerdos confidenciales y contratos para el desarrollo de estas invenciones. Algunas colaboraciones se han visto reforzadas por períodos cortos en laboratorios fuera de España durante un total de 12 meses. También participa en diferentes tareas docentes del departamento de Genética de la Universidad de Valencia y ha dirigido con éxito 3 tesis doctorales ya finalizadas y 2 en proceso de realización. En resumen, la Dra. M. Beatriz LLamusi se encuentra en un período de madurez a nivel personal (después de dos bajas por maternidad) y profesional (después de dirigir y obtener fondos para sus propias líneas de investigación), que demuestra el nivel de la investigación realizada y su capacidad para realizar desarrollos exitosos en áreas de alta relevancia biomédica.

