

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 438 617**

21 Número de solicitud: 201230936

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/04** (2006.01)

**G01N 33/532** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**15.06.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**17.01.2014**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE (100.0%)  
Ctra. de Utrera, km 1  
41013 Sevilla ES**

72 Inventor/es:

**SÁNCHEZ ALCÁZAR, José A.;  
CORDERO MORALES, Mario;  
DE LA MATA, Mario;  
COTÁN MARÍN, David;  
OROPESA ÁVILA, Manuel y  
GARRIDO MARAVER, Juan**

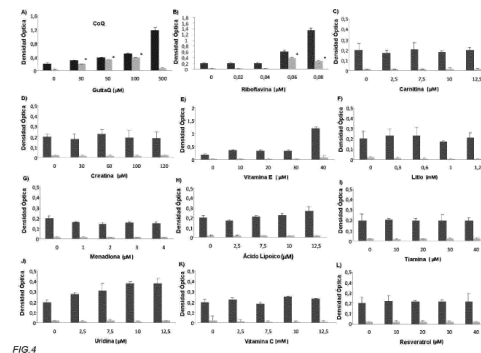
74 Agente/Representante:

**TEMIÑO CENICEROS, Ignacio**

54 Título: **Método para el cribado y/o evaluación de la eficacia de medicamentos para el tratamiento de enfermedades mitocondriales y síndrome MELAS**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a un procedimiento para la identificación y evaluación de la eficacia de fármacos para el tratamiento de enfermedades que cursan con disfunción mitocondrial y/o síndrome de MELAS, en un modelo de *Saccharomices cerevisiae* mutante A14G y en fibroblastos derivados de pacientes con síndrome MELAS y en cibridos transmitocondriales MELAS.



**DESCRIPCIÓN****MÉTODO PARA EL CRIBADO Y/O EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE MEDICAMENTOS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES MITOCONDRIALES Y SÍNDROME MELAS.****Campo de la invención**

5 La presente invención se encuadra en el campo general de la biomedicina y en particular se refiere a un método para el cribado y/o evaluación de la eficacia de un tratamiento para las enfermedades mitocondriales y síndrome MELAS.

**Estado de la técnica**

10 Las enfermedades mitocondriales abarcan un amplio espectro de trastornos neurodegenerativos, crónicos y progresivos, con manifestaciones fenotípicas y grados de afectación variables, como consecuencia de alteraciones en el metabolismo oxidativo mitocondrial [Zeviani M, Carelli V. Mitochondrial disorders. Curr Opin Neurol 2007;20:564-571]. A nivel celular, la patogénesis de estos desórdenes tiene su origen en un estado crónico de insuficiencia energética, debido a la incapacidad de las mitocondrias afectadas de generar suficiente ATP mediante el sistema OXPHOS (fosforilación oxidativa). Como consecuencia, se produce una conversión de piruvato a lactato, que sistémicamente se manifiesta como una acidosis láctica crónica. A menudo, las citopatías mitocondriales presentan un patrón multisistémico, siendo los tejidos con una fuerte demanda energética como el cerebro y el músculo, los órganos que aparecen afectados con mayor frecuencia.

15 Los 37 genes del DNA mitocondrial (mtDNA) son imprescindibles para la fosforilación oxidativa. De éstos, 13 codifican subunidades de los complejos de la cadena respiratoria: siete subunidades del complejo I, una subunidad del complejo III, tres subunidades del complejo IV y dos subunidades del complejo V. Las mutaciones de estos genes causan diversas alteraciones mitocondriales y generalmente presentan herencia materna. Además, se requieren 22 tRNA y 2 RNA ribosomales (rRNA) para la síntesis proteica mitocondrial.

20 En la última década, los investigadores clínicos también se han interesado por las alteraciones de la mitocondria con herencia mendeliana. El DNA nuclear (nDNA) codifica un amplio número de genes necesarios para la fosforilación oxidativa, incluyendo 72 subunidades polipeptídicas, así como todos los factores requeridos para el ensamblaje correcto de la cadena respiratoria y la maquinaria necesaria para la integridad, replicación, reparación y expresión del mtDNA. Del mismo modo, las mutaciones en los factores que se requieren para la traducción de proteínas en la mitocondria, la importación de proteínas, y la fusión/fisión de mitocondrias también causan alteraciones mitocondriales [Debray FG, Lambert M, Mitchell GA. Disorders of mitochondrial function. Curr Opin Pediatr 2008;20:471-482].

25 Las enfermedades mitocondriales son clínicamente heterogéneas debido a la distribución desigual de las mutaciones en los distintos tejidos, al grado de heteroplasmia de los tejidos afectados, a la segregación mitótica y a la variabilidad de penetrancia y de efecto umbral de las distintas mutaciones. La prevalencia de las enfermedades mitocondriales es de aproximadamente 1:5000 entre la población a nivel mundial.

30 Actualmente no se dispone de tratamientos eficaces para la mayor parte de ellas [Stacpoole PW. Why are there no proven therapies for genetic mitochondrial diseases? Mitochondrion 2011], limitándose éstos a medidas paliativas, generales y farmacológicas. Por lo general, se trata de procesos degenerativos, pero pueden tener un curso crónico estacionario, en forma de manifestaciones crónicas recurrentes, pudiendo mostrar en ocasiones una mejoría espontánea hasta su recuperación.

35 El síndrome MELAS debe su nombre al acrónimo en inglés de *Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes* (encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios semejantes a los accidentes cerebrovasculares). Fue descrito por primera vez por Pavlakis et al., en 1984. Los pacientes presentan unas manifestaciones clínicas que incluyen la tríada de síntomas que dan nombre a la enfermedad. Los accidentes cerebrovasculares afectan principalmente la región parieto-occipital del cerebro lo que conduce a defectos en el campo visual. Las convulsiones son comunes en estos pacientes asociadas a episodios de ictus o como un fenómeno aislado. Otras manifestaciones incluyen migrañas intermitentes, vómitos, depresión, ataxia, trastornos cognitivos, baja estatura, sordera, intolerancia al ejercicio, cardiomiopatía y diabetes mellitas [Sproule DM, Kaufmann P. Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and strokelikeepisodes: basic concepts, clinical phenotype, and therapeutic management of MELAS syndrome. Annals of the New York Academy of Sciences 2008;1142:133-158].

40 La edad de aparición de esta enfermedad se ha descrito inicialmente dentro del rango entre los 2 y los 60 años, aunque casi el 70% de los pacientes presentan los síntomas iniciales entre los 2 y los 20 años. La progresión de la enfermedad es frecuentemente dramática y los pacientes experimentan un progresivo deterioro neurológico y neuromuscular que resulta en demencia, severa invalidez y muerte repentina, a menudo antes de los 20 años. La supervivencia media después del diagnóstico es de 6,5 años. Dada la alta morbilidad y mortalidad del síndrome MELAS es necesaria la búsqueda de nuevos tratamientos capaces mejorar el pronóstico de la enfermedad.

El síndrome MELAS se trata de un desorden poligénico, asociado con al menos 29 mutaciones puntuales específicas en el mtDNA. La mutación más común relacionada con este síndrome, que supone un 80% de los casos, es la transición de una adenina a una guanina en la posición 3243 del genoma mitocondrial (A3243G), en el gen que codifica para el ARNtLeu (UUR), con una prevalencia de 0,06% de la población general [Sproule DM, Kaufmann P. Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes: basic concepts, clinical phenotype, and therapeutic management of MELAS syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008;1142:133-158]. Por otra parte, se han asociado a esta enfermedad al menos otras siete mutaciones puntuales en dicho gen, mutaciones en otros genes de ARNt (His, Lys, Gln y Glu) y en genes que codifican proteínas (MT-ND1, MT-CO3, MTND4, MT-ND5, MT-ND6 y MT-CYB) [Wong LJ. Pathogenic mitochondrial DNA mutations in protein-coding genes. *Muscle & nerve* 2007;36:279-293]. Muchas de estas mutaciones, particularmente las que afectan a subunidades proteicas, están implicadas en otros síndromes mitocondriales (Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber (LHON), Enfermedad de Leigh, Epilepsia Mioclónica asociada a Fibras Rojo-Rasgadas (MERRF)).

La mutación A3243G dificulta la modificación de la base U de balanceo, entorpeciendo la traducción de los codones UUA y UUG, lo que resulta en una incorporación alterada de los aminoácidos a las proteínas sintetizadas en la mitocondria [Kirino Y, Yasukawa T, Ohta S, Akira S, Ishihara K, Watanabe K *et al.* Codon-specific translational defect caused by a wobble modification deficiency in mutant tRNA from a human mitochondrial disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101:15070-15075]. Otros factores propuestos que también influyen en la síntesis alterada de proteínas mitocondriales son: trastornos en el procesamiento de los mRNA, cinética de aminoacilación incorrecta de los tRNA<sub>Leu</sub>(UUR) o conjugación incorrecta de los aminoácidos a tRNA<sub>Leu</sub>(UUR).

En esta enfermedad existe una deficiencia generalizada en la síntesis de proteínas mitocondriales, una disminución de la actividad de las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial y graves defectos respiratorios. Al menos el 42% de los pacientes con MELAS muestran una disminución de la actividad del complejo I, seguido de un 29% con disminución del complejo III y un 23% en el complejo IV [Santa KM. Treatment options for mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS) syndrome. *Pharmacotherapy* 2010;30:1179- 1196.]

En presencia de una cadena respiratoria disfuncional las mitocondrias no son capaces de producir suficientes cantidades de ATP. Esto conduce a un estado crónico de deficiencia energética, debido a un desequilibrio entre los requerimientos energéticos y la energía disponible. Finalmente, este desequilibrio energético causa daño celular y tisular. En general, la mutación A3243G provoca una mayor tasa glicolítica, aumento de la producción de lactato, oxidación reducida de la glucosa, una respuesta alterada a NADH, baja  $\Delta\Psi_m$ , una producción disminuida de ATP, aumento de ROS y una homeostasis del calcio intracelular alterada, disminución en la secreción de insulina, envejecimiento prematuro y una desregulación del metabolismo de los aminoácidos y la síntesis de la urea. Sin embargo, no se conoce con claridad como las mutaciones del mtDNA causan el daño celular y los mecanismos compensatorios que activa la célula para sobrevivir.

En trabajos previos, nuestro grupo ha demostrado como la mutación afecta la función mitocondrial en fibroblastos cultivados derivados de dos pacientes MELAS con la mutación A3243G [David Cotán MDC, Juan Garrido-Maraver, Manuel Oropesa-Ávila, Ángeles Rodríguez-Hernández, Lourdes Gómez Izquierdo, Mario De la Mata, Manuel De Miguel, Juan Bautista Lorite, Eloy Rivas Infante, Sandra Jackson, Plácido Navas, and José A. Sánchez-Alcázar. Secondary coenzyme Q10 deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy in MELAS fibroblasts. *FASEB J* 2011]. Los fibroblastos MELAS mostraron actividades enzimáticas respiratorias reducidas, deficiencia en CoQ y despolarización mitocondrial. La disfunción mitocondria se asoció a un aumento de la producción de ROS, la activación de la transición de permeabilidad mitocondrial (MPT) y la eliminación de las mitocondrias alteradas por mitofagia.

Para el estudio de las bases moleculares y celulares de las enfermedades mitocondriales, así como para la identificación y evaluación de la acción de agentes terapéuticos, son necesarios modelos sencillos de investigación. Hay diferentes organismos modelos para el estudio de los defectos mitocondriales codificados por el genoma nuclear. Sin embargo éstos no son válidos en el caso de los defectos codificados por el genoma mitocondrial, ante la imposibilidad, en general, de manipular el mtDNA. Por ello, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* constituye una herramienta útil, ya que se pueden introducir mutaciones puntuales en su ADNmt por biobalística, tales como sustitución de bases en genes del ARNt mitocondrial (ARNt mt) equivalentes a las que originan enfermedades neurodegenerativas humanas. Esto es posible porque los ARNt mitocondriales de levaduras y de humanos son similares en secuencia y estructura, excepto por la presencia de un *loop* más largo en levaduras que en humanos. Son diversas las ventajas del empleo de *S. cerevisiae* como organismo modelo: elevada tasa de crecimiento, mantenimiento económico, clasificación como microorganismo GRAS (generalmente reconocido como seguro), genoma totalmente secuenciado, adecuado para la expresión de proteínas heterólogas, contiene multitud de marcadores selectivos incluyendo marcadores de auxotrofías y de resistencia. Las levaduras son además particularmente útiles para el estudio de enfermedades mitocondriales humanas gracias a su capacidad de sobrevivir en un medio con una fuente de carbono fermentable, a pesar de que su cadena respiratoria no sea funcional. Cuando la concentración de glucosa es reducida, las levaduras

mutantes deficientes en respiración crecen lentamente, dando lugar a pequeñas colonias (*petite*). Estos mutantes *petite* presentan anomalías en el ADNmt en forma de reordenamientos múltiples (*petites rho-*) o de pérdida de ADNmt (*petites rho<sup>0</sup>*). Como ya se ha indicado anteriormente, la mutación causante del 80% de los casos de síndrome MELAS es la transición de una adenina a una guanina en la posición 3243 del genoma mitocondrial (m.3243A>G), en el gen que codifica el ARNtLeu (UUR). Esta mutación se encuentra en una región muy conservada entre el genoma mitocondrial humano y el de levaduras (Figura 1).

El nucleótido A14 del ARNt participa en una interacción terciaria canónica con el nucleótido uridina en posición 8 (Figura 2), lo que estabiliza la estructura secundaria del ARNt y condiciona su funcionalidad. Por tanto, la mutación A14G en levaduras da lugar a un reordenamiento conformacional del brazo D del ARNt y una disminución en la eficiencia de la aminoacilación [Montanari A, Besagni C, De Luca C, Morea V, Oliva R, Tramontano A *et al.* Yeast as a model of human mitochondrial tRNA base substitutions: investigation of the molecular basis of respiratory defects. RNA (New York, NY 2008;14:275-283].

La mutación A3243G, al igual que otras mutaciones relacionadas con el síndrome MELAS en humanos, se ha comprobado que impide la modificación de uridina con un residuo de taurina (5-taurinometil uridina,  $\tau\text{m}^5\text{U}$ ) en la posición de tambaleo del anticodón, y la falta de esta modificación ha sido propuesta como la responsable del efecto patológico. Parece ser que la enzima responsable de llevar a cabo esta modificación reconoce la estructura terciaria del ARNt completo, la cual se ve afectada como consecuencia de esta mutación. La alteración del ARNtLeu (UUR) mitocondrial muestra una traducción reducida de UUG, mientras que no se produce una disminución en la traducción de UUA (Figura 3). Este defecto en la traducción específica del codón UUG se debe a la incapacidad de formar el apareamiento de bases entre el codón y el anticodón en el sitio A del ribosoma, lo cual sugiere que la modificación  $\tau\text{m}^5\text{U}$  en este ARNt juega un papel importante en la estabilización del apareamiento de las bases U:G en la posición de tambaleo. Esto podría explicar el defecto en la traducción del gen que codifica el componente ND6 del Complejo I de la cadena respiratoria y que es rico en codones UUG.

Por todo ello, se piensa que la principal causa molecular del síndrome MELAS es la traducción deficiente del codón UUG como consecuencia del defecto en la modificación de la taurina en la posición de tambaleo del anticodón, que se traduce en una reducción de la actividad del Complejo I, que es uno de los síntomas característicos que se ha encontrado en los pacientes. En levaduras, la mutación A14G en el ARNt(Leu) (UUR), equivalente a la que se produce en humanos, origina deficiencias respiratorias graves con una alta producción de mutantes deficientes en ADNmt (*rho<sup>0</sup>*). El porcentaje de colonias *rho<sup>0</sup>* supone un buen indicador de la gravedad del fenotipo respiratorio. Las cepas de levaduras portadoras de la mutación A14G pueden crecer en medio fermentativo (con glucosa o galactosa como fuente de carbono), pero pierden rápidamente el ADNmt, lo que indica que tienen un defecto grave en la síntesis de proteínas mitocondriales. En cambio, estas levaduras son incapaces de crecer en medio respiratorio (con glicerol como fuente de carbono). La utilización de levaduras para el estudio de enfermedades mitocondriales debidas a alteraciones en el ARNt mitocondrial presenta como limitación que éstas son homoplásmicas a diferencia de las células humanas, que son heteroplásmicas. Por tanto, los modelos de levaduras de estas patologías no permiten evaluar el efecto umbral. A pesar de esto, constituyen una herramienta muy útil para la simplificación de un sistema complejo. Las levaduras no son útiles exclusivamente para comprender los efectos de las mutaciones de las enfermedades mitocondriales, pueden utilizarse también para el cribado masivo de fármacos capaces de revertir los defectos en el crecimiento dependiente de la respiración característico de las levaduras mutantes mitocondriales. Éste es un ensayo rápido y sensible que permite el cribado de miles de fármacos de forma robotizada y económica. Sin embargo, y a pesar de que decenas de modelos de levaduras de enfermedades mitocondriales están disponibles, hay escasos estudios de su utilidad para el cribado masivo de fármacos.

Los estudios bioquímicos de los fibroblastos derivados de pacientes mitocondriales han suministrado una gran cantidad de información para comprender las alteraciones fisiopatológicas presentes en esta enfermedad. Por su parte, las líneas celulares transmitocondriales o cíbridos son una de las herramientas fundamentales en la investigación mitocondrial. Los cíbridos son generados cuando los contenidos citoplasmáticos de dos líneas celulares diferentes coexisten dentro de una misma membrana plasmática. Específicamente, esta aproximación experimental se diseña para que las mitocondrias que residen en una célula se incorporen permanentemente al citoplasma de otra célula a la que previamente se ha desprovisto de mtDNA y que por tanto no tienen mitocondrias funcionales [Khan SM, Smigrodzki RM, Swerdlow RH. Cell and animal models of mtDNA biology: progress and prospects. American journal of physiology 2007;292:C658-669]. De esta forma las alteraciones fisiopatológicas detectadas en los cíbridos se deberán a las mitocondrias disfuncionales independientemente del contexto nuclear. Ambos modelos, fibroblastos y cíbridos, resultan pues muy eficaces para conocer los mecanismos moleculares de la enfermedad mitocondrial y el cribado de diferentes tratamientos que supriman o mejoren las alteraciones fisiopatológicas detectadas.

Actualmente, las opciones terapéuticas para el tratamiento del síndrome MELAS y para otras enfermedades mitocondriales son muy limitadas. En general, el tratamiento recibido por los pacientes con citopatías mitocondriales está orientado a tratar los síntomas (por ejemplo, alteraciones cardíacas, renales, nutricionales, tratamiento de la epilepsia, etc), junto con el suplemento con un cóctel mitocondrial.

Existen en la actualidad diferentes fármacos dirigidos a tratar de corregir los mecanismos patogénicos de las enfermedades mitocondriales, siendo tres los principales mecanismos sobre los que puede actuar los fármacos de forma específica:

5 1) Fármacos que modifican la función de la cadena respiratoria o previenen el estrés oxidativo: CoQ, idebenona, succinato, vitamina C, vitamina K3, riboflavina-B2, tiamina- B1, citocromo c, monohidrato de creatina, cobre, uridina.

2) Fármacos que reducen el acumulo de metabolitos tóxicos para las células: Carnitina, dicloroacetato, inhibidores del flujo del calcio mitocondrial (CGP37157).

10 3) Fármacos que actúan como antioxidantes: CoQ, vitamina E. 4) Otros tratamientos farmacológicos: Ácido fólico, cuerpos cetónicos.

Desafortunadamente, los estudios que demuestran la eficacia de los diversos tratamientos farmacológicos actuales no son concluyentes. Por otro lado, la evaluación de la eficacia de estos tratamientos es complicada por la relativa rareza de la enfermedad, la presencia de síntomas diversos, y el curso impredecible de la enfermedad.

15 La ausencia de pruebas concluyentes a favor de las terapias o combinación de las terapias actuales y la naturaleza progresiva del síndrome hace extremadamente difícil el tratamiento y la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas.

20 La baja prevalencia de la enfermedad dificulta el diseño de ensayos clínicos y estudios de nuevos fármacos a gran escala, dejando sólo los casos clínicos como la primera fuente de conocimiento y guía para los médicos clínicos. Además, muchos de los ensayos clínicos disponibles incluyen pacientes con múltiples tipos de enfermedades mitocondriales, haciendo difícil la extrapolación de los resultados a los pacientes MELAS.

25 Existe pues la necesidad de encontrar y clarificar distintas terapias para el síndrome MELAS, que permitan verificar la eficacia de los principios activos ganando con ello en especificidad y eficacia en el tratamiento. De esta manera además de proporcionar terapias eficaces en el síndrome MELAS se pueden proporcionar terapias relevantes para otras enfermedades mitocondriales y otras enfermedades del adulto como la diabetes, la enfermedad de Parkinson, arteriosclerosis, la enfermedad cerebrovascular, la enfermedad de Alzheimer, y el cáncer en las que también juega un papel determinante la disfunción mitocondrial. Además, muchas drogas utilizadas en la práctica clínica (como los antivirales, antibióticos, etc...) causan daño mitocondrial que podría aliviarse con los nuevos tratamientos.

### Descripción de la invención

30 Así pues la presente invención se refiere a un procedimiento para la identificación y evaluación de la eficacia de fármacos para el tratamiento de enfermedades que cursan con disfunción mitocondrial y/o síndrome de MELAS caracterizado porque comprende los siguientes pasos:

35 a) cribado de fármacos en un modelo de *Saccharomices cerevisiae* mutante A14G, mediante la exposición de dichas levaduras a al menos un fármaco y determinar si dicho fármaco produce crecimiento celular de las levaduras mutantes A14G. En un aspecto más en particular el crecimiento celular de las levaduras mutantes A14G del paso a) se puede realizar por cualquier método del estado de la técnica conocido por un experto en la materia. En una realización preferida, en el procedimiento de la presente invención el crecimiento celular de las levaduras mutantes se determina mediante densidad óptica.

40 b) evaluación de la eficacia del fármaco que produce crecimiento celular de las levaduras mutantes A14G del paso a) en modelos celulares derivados de pacientes con síndrome MELAS y determinar si el fármaco es eficaz mediante la capacidad que tiene dicho fármaco para restaurar las alteraciones fisiopatológicas de dichos modelos celulares,

45 En un aspecto más en particular, los modelos celulares derivados de pacientes con síndrome MELAS del paso b) del procedimiento de la presente invención, son fibroblastos derivados de pacientes con síndrome MELAS y/o en cíbridos transmitocondriales MELAS.

En un aspecto más en particular las alteraciones fisiopatológicas restauradas en los modelos celulares del paso b) del procedimiento de la presente invención, son un aumento de la proliferación celular, un aumento de los niveles de ATP, una disminución de ROS, una disminución de la actividad mitofágica, un aumento de la expresión de proteínas mitocondriales y/o aumento de la actividad mitocondrial.

50 En la presente invención por enfermedades que cursan con disfunción mitocondrial se refiere a enfermedades mitocondriales y otras enfermedades del adulto como la diabetes, la enfermedad de Parkinson, arteriosclerosis,

la enfermedad cerebrovascular, la enfermedad de Alzheimer, y el cáncer en las que la disfunción mitocondrial juega un papel determinante en el curso de la enfermedad.

5 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un fármaco identificado mediante el procedimiento de la presente invención para el tratamiento de enfermedades que cursan con disfunción mitocondrial y/o síndrome de MELAS.

### Descripción de las figuras

La figura 1 muestra la estructura del ARNt<sup>Leu(UUR)</sup> de levaduras (A) y de humanos (B), mostrando la posición de la mutación A14G y A3243G.

La figura 2 muestra la estructura tridimensional del ARNt (A) y el apareamiento de bases de A14 y U8 (B).

10 La figura 3 muestra la estructura química de la 5-Taurinometil uridina ( $\tau m^5U$ ) (A) y de la taurina (B). (C) Mutación puntual del ARNt<sup>Leu(UUR)</sup>, que evita la modificación de una uridina a taurina en la posición de tambaleo del anticodón, dando lugar a un patrón anormal de reconocimiento del codón.

15 La figura 4 muestra los resultados obtenidos con el método descrito en la presente invención: A) CoQ, B) riboflavina, C) carnitina, D) creatinina, E) vitamina E, F) Litio, G) menadiona, H) ácido lipoico, I) tiamina, J) uridina, K) vitamina C, L) resveratrol.

La figura 5: imágenes de inmunofluorescencia que demuestran que el tratamiento con CoQ y riboflavina disminuye drásticamente la mitofagia presente en los fibroblastos MELAS (panel A). La mitofagia es cuantificada como el número de puntos discretos donde se colocan el marcador mitocondrial citocromo c y el marcador autofágico LC3 panel B y C.

20 La figura 6: A: levaduras silvestres (WT) crecidas en medio YPD, B: levaduras mutantes (MUT) A14G en medio YPD, C: levaduras WT en medio YPG, D: levaduras MUT A14G en medio YPG.

### Descripción detallada de la invención

#### *Ejemplo 1: Cribado de fármacos en modelo de Saccharomices cerevisiae*

25 Para demostrar la validez de los modelos celulares en la búsqueda de nuevos tratamientos farmacológicos para el síndrome MELAS se realizaron una serie de ensayos piloto para comprobar la validez de los tratamientos utilizados más habitualmente en la práctica clínica en los modelos de levaduras, fibroblastos y cíbridos MELAS.

Para el cribado de fármacos, se utilizaron dos estirpes de *S. cerevisiae*: la estirpe silvestre MCC123 (Mat  $\alpha$ , ade2-1, ura3-52, kar1-1, (WT) que se utiliza como estirpe control y la estirpe mutante A14G equivalente a la mutación A3243G en el gen mitocondrial tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> responsable del síndrome MELAS en humanos.

30 Las levaduras fueron crecidas en medio completo que contenía 2% de glucosa (YPD) o 3% de glicerol (YPG). Los medios fueron solidificados con 1,5% de agar.

35 Para la realización los experimentos las levaduras se recogieron de colonias en placas YPG y fueron transferidas a 5ml de medio YPG para obtener una densidad óptica de 0,5. Tras 3 h de incubación a 28°C en medio líquido, se controló la presencia de mtDNA por tinción con DAPI y el experimento se continuó cuando el cultivo tuvo un 70-80% de células con mtDNA.

Posteriormente, los cultivos de levaduras fueron distribuidos en placas de 96 pocillos y fueron expuestas a las diferentes concentraciones de los tratamientos.

40 Tras 24 horas de incubación, se midió la densidad óptica a 660 nm de cada pocillo como indicador de crecimiento celular. Cada placa fue replicada 4 veces en YPG. La media de los 4 replicados se normalizó. Los pocillos control fueron colocados igualmente en cada placa. Los fármacos ensayados a diferentes concentraciones fueron: Creatina, Tiamina, Vitamina E, Vitamina C (Ácido ascórbico), Menadiona, Ácido lipoico, L- Arginina, Carnitina, Riboflavina, Resveratrol, Litio, Uridina y CoQ.

45 En el cribado inicial en levaduras mutantes MELAS sólo se consiguieron resultados positivos con dos fármacos, CoQ y riboflavina como muestra la figura 4, dos de los fármacos más utilizados y con mejor respuesta terapéutica en el tratamiento del síndrome MELAS en la práctica clínica.

Ejemplo 2: Evaluación de los fármacos seleccionados en modelos fibroblastos derivados de pacientes MELAS y en cíbridos transmitocondriales MELAS.

Los principios activos seleccionados en el cribado inicial en levaduras fueron posteriormente evaluados por su capacidad de mejorar las alteraciones fisiopatológicas en fibroblastos y cíbridos MELAS.

5 Una vez determinada la concentración óptima de los dos fármacos (CoQ y riboflavina), mediante el ensayo de crecimiento en levaduras, se procedió a tratar durante dos semanas con dichas concentraciones a los fibroblastos y cíbridos para determinar su actuación sobre las alteraciones fisiopatológicas detectadas previamente.

La proliferación de las células fue determinada mediante el recuento microscópico con cámara de Neubauer. Las alteraciones mitocondriales que afectaban al nivel energético celular y promovían la acumulación de metabolitos tóxicos repercutieron directa y negativamente en el correcto crecimiento y proliferación de las células.

10 Para el análisis de la cadena respiratoria mitocondrial en primer lugar se determinaron las actividades enzimáticas de la cadena respiratoria y el consumo de oxígeno en las células en cultivo. Específicamente, se determinaron las actividades de la NADH deshidrogenasa (Complejo I), succinato deshidrogenasa (complejo II), NADH-citocromo c reductasa sensible a rotenona (complejo I+III), succinato-citocromo c reductasa (complejo II+III) y citocromo c oxidasa (complejo IV). La actividad de la citrato sintasa, un enzima de matriz mitocondrial, se midió para normalizar las actividades a la cantidad relativa de mitocondrias. Las tinciones citoquímicas para la citocromo c oxidasa (COX) y la succinato deshidrogenasa (SDH) completaron los estudios bioquímicos. A  
15 continuación, se analizó la capacidad respiratoria de las células mediante técnicas polarográficas que miden la velocidad de consumo de oxígeno en los fibroblastos intactos con un electrodo de Clark (Yellow Spring). Igualmente se midieron los niveles de producción de ácido láctico en el medio de cultivo como medida del grado  
20 de disfunción mitocondrial y compensación por la ruta glicolítica y los niveles de ATP intracelulares como medida que orientativa en el grado de alteración bioenergética.

El consumo de oxígeno se determinó utilizando un electrodo de Clark (Yellow Springs Instruments Co, Yellow Springs, OH).

25 Los niveles de ácido láctico en el medio de cultivo se midieron utilizando el kit comercial L-lactic acid de Boehringer-Mannhein.

Los niveles de ATP se determinaron mediante el kit comercial ATP bioluminescence assay kit HS II (Roche Applied Science) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras se midieron utilizando un luminómetro equipado con inyector (Lumat LB 9505, Berthold).

30 La biosíntesis del CoQ en las células en cultivo se estudió con el marcaje metabólico con precursores radiactivos. Para confirmar el defecto bioquímico en la síntesis del CoQ, se utilizó como precursor radiactivo, el ácido 4-hidroxi[U-14C]benzoico (4-[U-14C]HB) un precursor del anillo quinónico del CoQ, y [5-3H]mevalonolactona ([3H]MVL) como precursor de la cadena lateral isoprenoide (American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, MO), de acuerdo al protocolo seguido por Nambudiri y colaboradores [Nambudiri, A. M., Ranganathan, S., and Rudney, H. (1980) The role of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in  
35 the regulation of ubiquinone synthesis in human fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry* **255**, 5894-5899].

La síntesis de proteínas mitocondriales en cultivos de fibroblastos control y MELAS se evaluó esencialmente midiendo la incorporación de [<sup>35</sup>S]- metionina en presencia de emetina (un inhibidor de la síntesis de proteínas citoplasmáticas). Las proteínas marcadas radioactivamente que corresponden a la síntesis mitocondrial fueron precipitadas con ácido tricloroacético (10%) y analizadas mediante un contador de centelleo líquido.

40 La electrophoresis nativa en geles de poliacrilamida fue utilizada para la separación de los complejos respiratorios mitocondriales. Posteriormente las proteínas fueron electro-transferidas a una membrana de celulosa. Los diferentes complejos respiratorios fueron visualizados utilizando anticuerpos contra el complejo I, complejo I, complejo III, complejo IV y complejo V y son revelados por quimioluminiscencia.

45 Los niveles de expresión de las proteínas mitocondriales fueron determinados por Western Blotting e Inmunofluorescencia. Muchas de las alteraciones mitocondriales cursan con niveles de expresión disminuidos de las proteínas mitocondriales. Sin embargo, en ocasiones se observan aumentos compensatorios de otras proteínas mitocondriales. La monitorización de los niveles de expresión de estas proteínas mediante las técnicas de Western Blotting e inmunofluorescencia sirvió para valorar la severidad de la enfermedad mitocondrial y comprobar la eficacia de los tratamientos ensayados.

50 En una célula animal típica, la mayor parte del ATP se sintetiza a partir de ADP y fosfato mediante la fosforilación oxidativa mitocondrial. En este proceso los tres centros redox de la cadena respiratoria mitocondrial bombean hidrogeniones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembranas, desarrollando una fuerza protonmotriz o potencial de membrana mitocondrial del orden de - 180 mV. Esa fuerza protonmotriz permite la síntesis de ATP mediante la ATPsintetasa. Las alteraciones del potencial de membrana mitocondrial reflejan alteraciones

funcionales de las mitocondrias. El potencial de membrana mitocondrial fue medido utilizando el fluorocromo JC-1.

5 Para determinar la producción de ROS, se utilizaron distintos fluorocromos sensibles a dichas ROS. La sonda 2'-7' diclorofluoresceína diacetato (DCFDA) es oxidada preferentemente por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generando una fluorescencia verde. La fluorescencia se midió en un citómetro de flujo.

Para analizar la peroxidación lipídica, las mitocondrias aisladas se resuspendieron en PBS y se midieron los lipoperóxidos utilizando un kit LPO-560 (OxisResearch, Portland, OR).

Para determinar los niveles de daño oxidativo a las proteínas de las mitocondrias se midieron las proteínas mitocondriales carboniladas utilizando el kit OxyBlot (Intergen, Purchase, NY).

10 En las enfermedades mitocondriales la alteración de la función mitocondrial induciría un aumento del estrés oxidativo mitocondrial, la activación de la transición de permeabilidad mitocondrial, y la activación de un programa de degradación selectiva de las mitocondrias malfuncionantes por mitofagia. La mitofagia fue caracterizada mediante las siguientes técnicas: 1) Observación de los autofagosomas por microscopía electrónica; 2) Aumento de la actividad lisosomal: ensayo de la beta-galactosidasa; 3) Colocalización de marcadores mitocondriales como el citocromo c con marcadores lisosomales como la catepsina o LysoTracker (invitrogen); 4) Localización mitocondrial de marcadores de autofagia como LC3, ATG12; 5) Expresión de los genes (genes ATG) y proteínas que participan en la mitofagia por Western Blotting y PCR a tiempo real.

La integridad del flujo autofágico se midió mediante la incubación de los fibroblastos y cíbridos MELAS en presencia de bafilomicina y posteriormente determinando el aumento de LC3-II mediante Western blotting.

20 Biogénesis mitocondrial se determinó mediante la masa mitocondrial (actividad citrato sintasa) y los niveles de expresión de los factores de biogénesis mitocondrial como mecanismo compensatorio ante la eliminación de las mitocondrias disfuncionales. Se estudió la expresión y activación de factores relacionados con la biogénesis mitocondrial como el factor de transcripción mitocondrial Tfam, el factor respiratorio nuclear NRF-1 y NRF-2, y el receptor activado de proliferación de peroxisomas (PGC-1-alfa). Además se determinó el número de copias de ADN mitocondrial por PCR en tiempo real.

30 La apoptosis inducida fue estudiada tratando las células con camptotecina (un inhibidor de la topoisomerasa I) y retirada de suero o tratamiento con estaurosporina (inhibidor de la proteína quinasa C). La apoptosis se valoró mediante citometría de flujo e inmunofluorescencia. Se detectó en los cultivos de fibroblastos las células con la activación de las caspasas, la liberación de citocromo c, la condensación y fragmentación celular y demás parámetros característicos de las células apoptóticas.

35 Los resultados demostraron que el tratamiento con CoQ y riboflavina aumentó la proliferación celular, aumentó los niveles de ATP, redujo la producción de ROS, disminuyó la actividad mitofágica y aumentó la expresión de proteínas y actividades enzimáticas mitocondriales en fibroblastos y cíbridos MELAS (Figura 5). Estos resultados indicaron que aquellos fármacos capaces de suprimir el defecto respiratorio en el cribado inicial en levaduras fueron igualmente capaces de revertir las alteraciones fisiopatológicas en fibroblastos y cíbridos MELAS.



**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para la identificación y evaluación de la eficacia de fármacos para el tratamiento de enfermedades que cursan con disfunción mitocondrial y/o síndrome de MELAS caracterizado porque comprende los siguientes pasos:
- 5 a) cribado de fármacos en un modelo de *Saccharomyces cerevisiae* mutante A14G, mediante la exposición de dichas levaduras a al menos un fármaco y determinar si dicho fármaco produce crecimiento celular de las levaduras mutantes A14G,
- b) evaluación de la eficacia del fármaco que produce crecimiento celular de las levaduras mutantes A14G del paso a) en modelos celulares derivados de pacientes con síndrome MELAS y determinar si el fármaco es eficaz mediante la capacidad que tiene dicho fármaco para restaurar las alteraciones fisiopatológicas de dichos modelos celulares,
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque los modelos celulares derivados de pacientes con síndrome MELAS del paso b), son fibroblastos derivados de pacientes con síndrome MELAS y/o en cíbridos transmitocondriales MELAS.
- 15 3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las alteraciones fisiopatológicas restauradas en los modelos celulares del paso b) son un aumento de la proliferación celular, un aumento de los niveles de ATP, una disminución de ROS, una disminución de la actividad mitofágica, un aumento de la expresión de proteínas y/o aumento de la actividad mitocondrial.
- 20 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el crecimiento celular de las levaduras mutantes A14G del paso a) se realiza mediante densidad óptica.

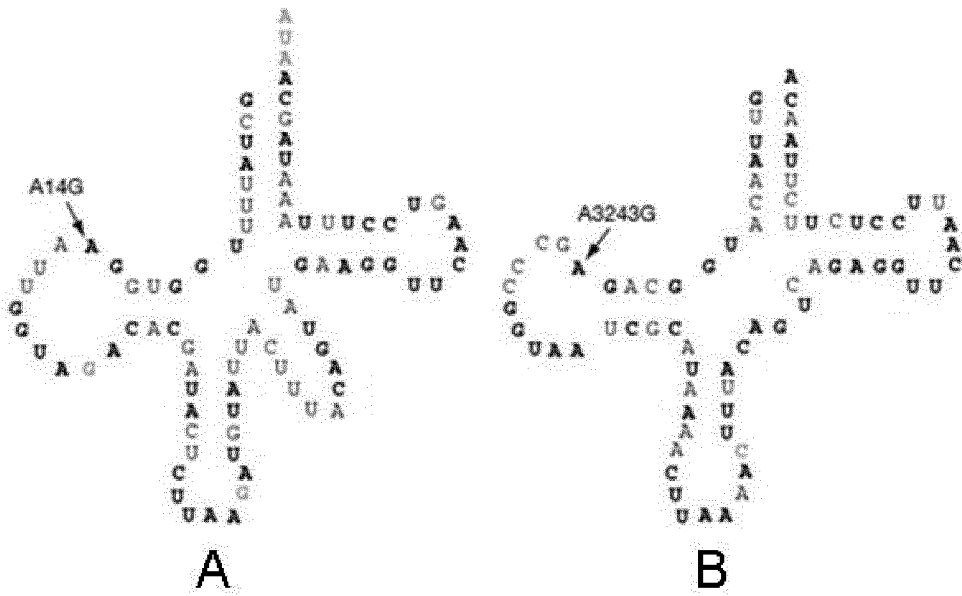


FIG. 1

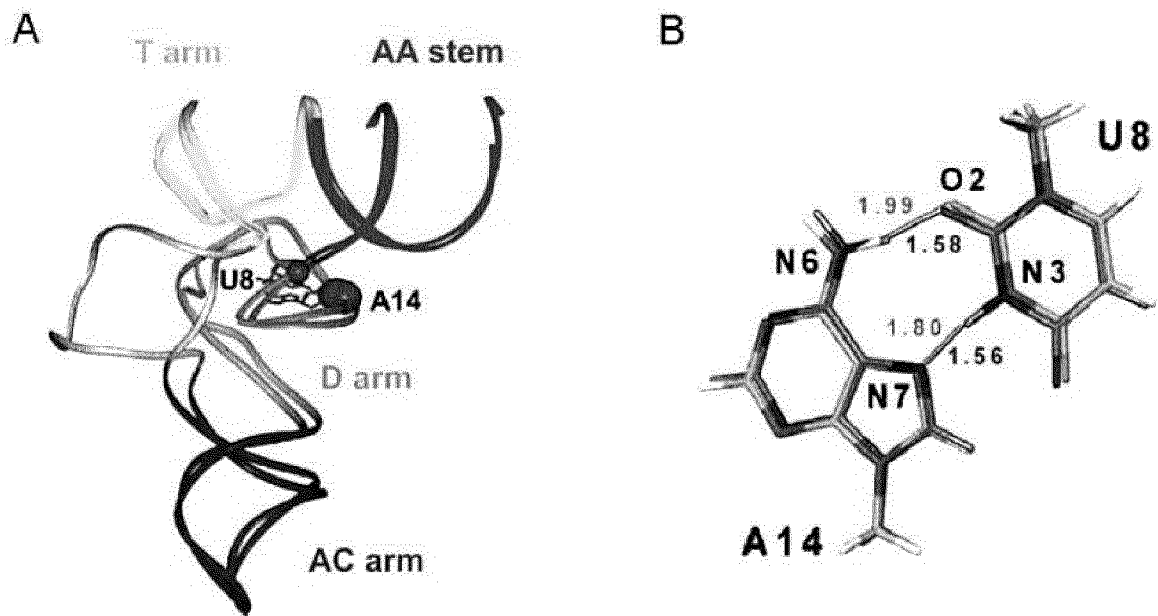
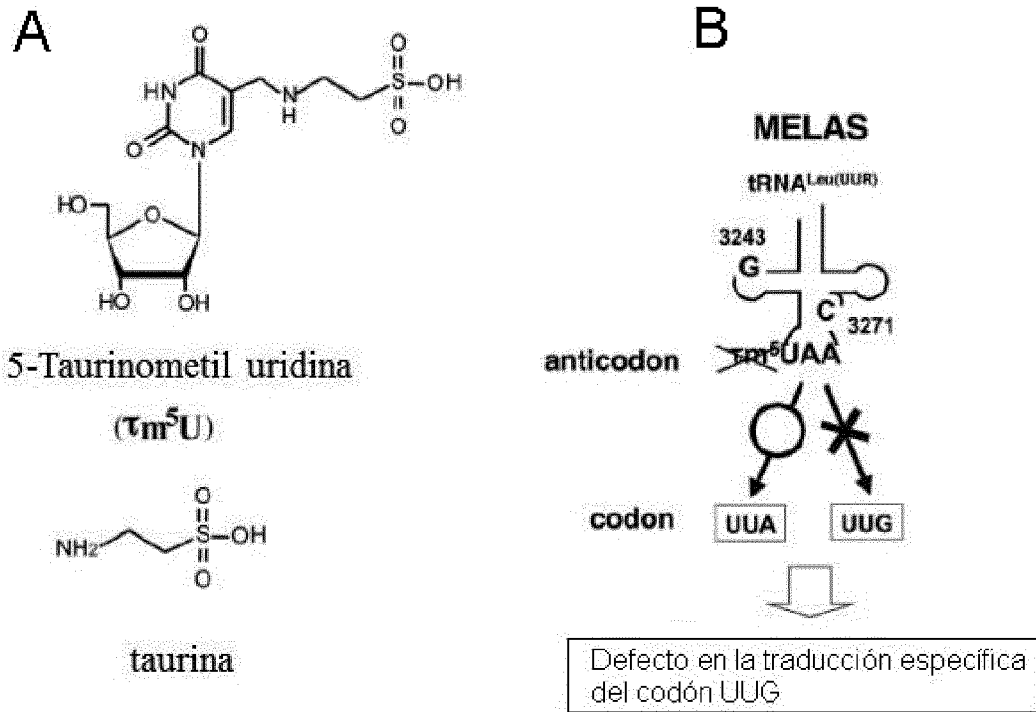


FIG. 2



**FIG. 3**

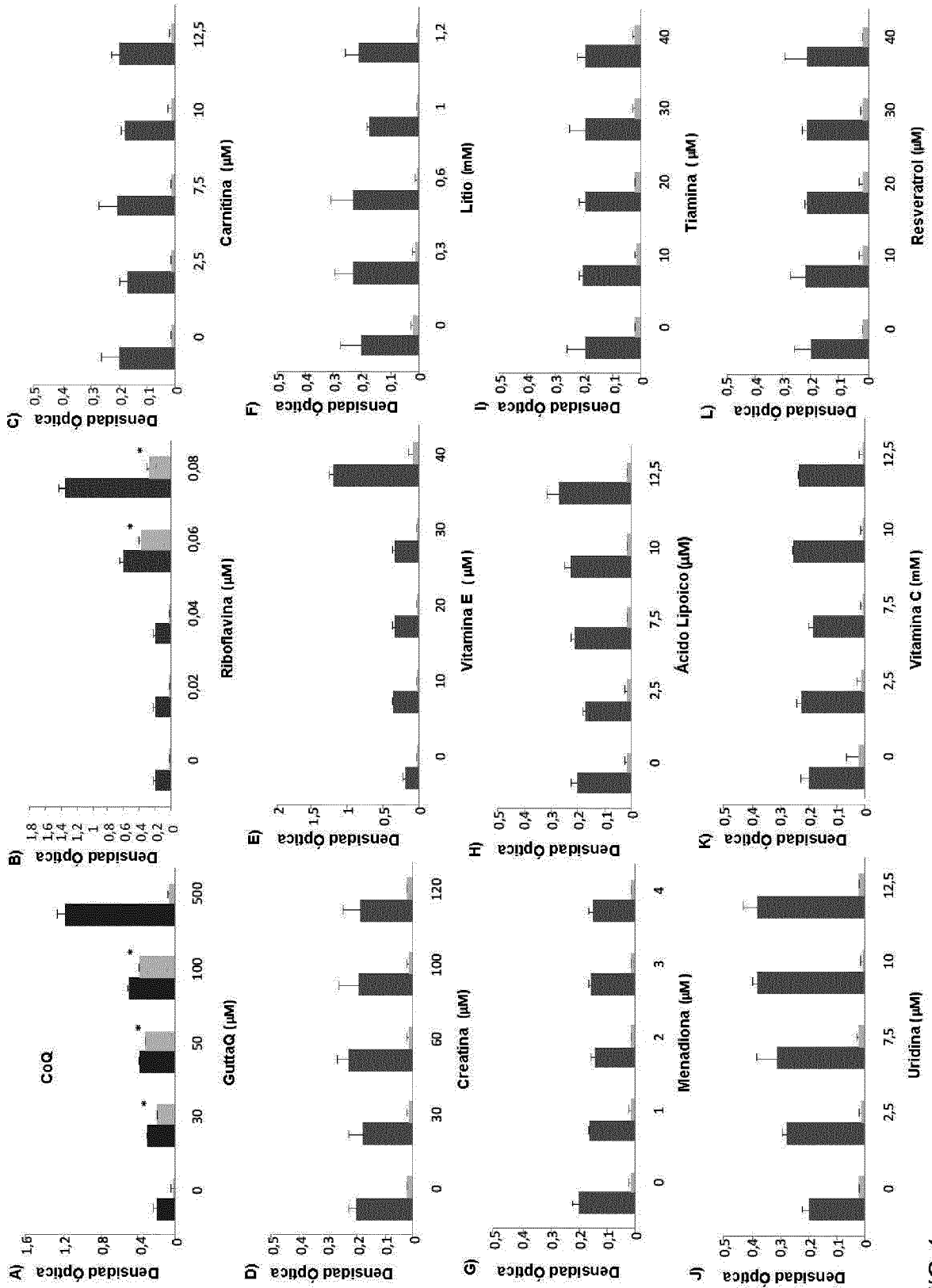
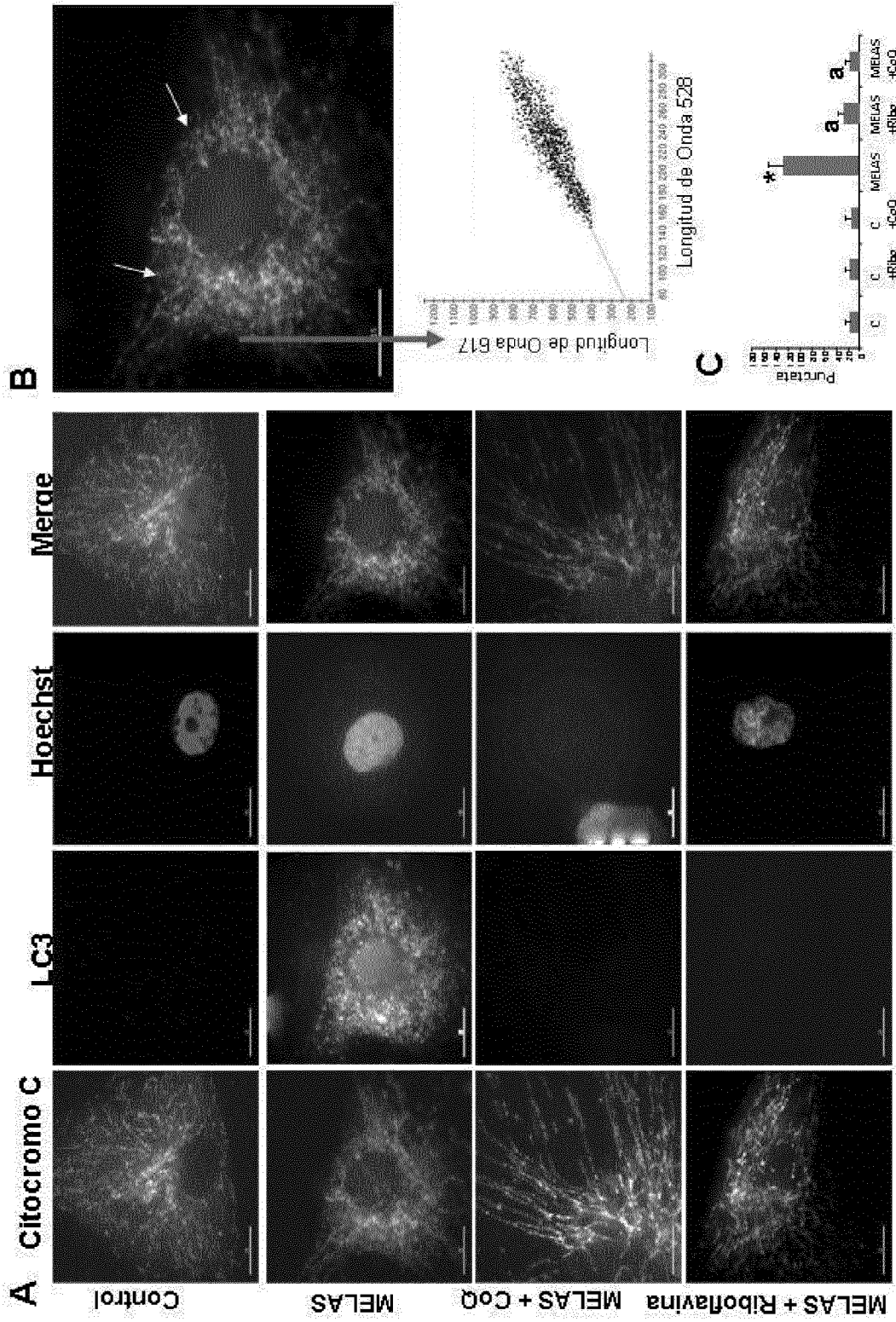


FIG.4



**FIG.5**

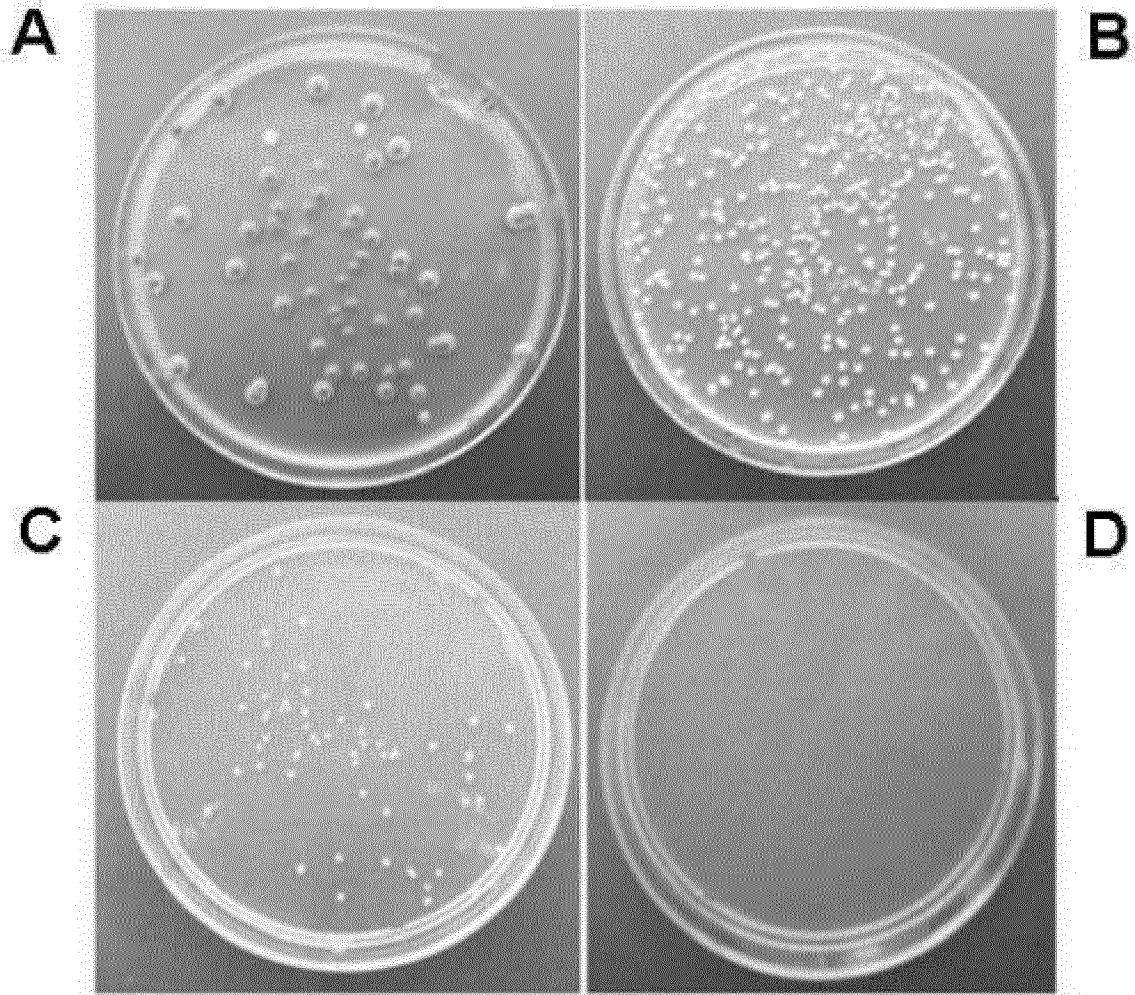


FIG.6



- ②① N.º solicitud: 201230936  
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 15.06.2012  
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/04** (2006.01)  
**G01N33/532** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 5888498 A (DAVIS et al.) 30.03.1999, columna 3, línea 23 – columna 5, línea 53; reivindicaciones 1-10,18.	1-4
A	WO 03087768 A2 (MITOKOR [US/US] ) 23.10.2003, página 8, línea 8 – página 9, línea 3; reivindicaciones 1-4.	1-4
A	FEUERMANN M. et al. The yeast counterparts of human 'MELAS' mutations cause mitochondrial dysfunction that can be rescued by overexpression of the mitochondrial translation factor EF-Tu. EMBO reports 2003. Vol. 4(1), páginas: 53-58, todo el documento.	1-4

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**  
04.10.2013

**Examinador**  
M. D. García Grávalos

**Página**  
1/4

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

C12Q, G01N

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, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, PUBMED, GOOGLE PATENTS, GOOGLE SCHOLAR.



Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 04.10.2013

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-4	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-4	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<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 5888498 A	30.03.1999
D02	WO 03087768 A2	23.10.2003
D03	FEUERMANN M. et al. EMBO reports 2003. Vol. 4(1), páginas: 53-58.	2003

**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 un procedimiento para la identificación y evaluación de la eficacia de fármacos para tratamiento de enfermedades que cursan con disfunción mitocondrial y/o síndromes de MELAS en un modelo de *Saccharomyces cerevisiae*, mutante A14G y en fibroblastos derivados de pacientes con síndrome MELAS y en cíbridos transmitocondriales MELAS (reivindicaciones 1-4).

El documento D01 divulga líneas celulares cíbridas formadas por cultivos de células inmortalizadas trasplantadas con ADN mitocondrial de diferente origen biológico, que puede provenir de células de sujetos que padecen una enfermedad de origen mitocondrial, y su uso en modelos de *screening* para diagnóstico, evaluación y terapia de la enfermedad (ver columna 3, línea 23 - columna 5, línea 53; reivindicaciones 1-10, 18).

El documento D02 divulga un método para identificar proteínas mitocondriales útiles como dianas en ensayos de *screening* para detección de fármacos para tratamiento de enfermedades relacionadas con desórdenes mitocondriales como es el síndrome MELAS (ver página 8, línea 8 - página 9, línea 3; reivindicaciones 1-4).

El documento D03 divulga un estudio sobre la similitud entre la mutación producida en el genoma mitocondrial humano relacionada con el síndrome MELAS, transición de una adenina a una guanina en la posición 3243 (A3243G), en el gen que codifica para el ARNtLeu (UUR) y la producida en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, transición de una adenina a una guanina en la posición 14 (A14G). Se refiere al beneficio que este hecho reporta en la creación de modelos para estudio de moléculas de tRNAs y de polimorfismos asociados a anomalías patológicas debido a que las células de levaduras ofrecen mejores posibilidades de manipulación y transformación genética (ver todo el documento).

**1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)**

El objeto técnico de la presente solicitud es un procedimiento para la identificación y evaluación de la eficacia de fármacos para tratamiento de enfermedades que cursan con disfunción mitocondrial y/o síndromes de MELAS en un modelo de *Saccharomyces cerevisiae*, mutante A14G y en fibroblastos derivados de pacientes con síndrome MELAS y en cíbridos transmitocondriales MELAS.

**1.1. REIVINDICACIONES 1-4**

En el estado de la técnica se encuentran métodos para desarrollar ensayos de *screening* para detección de fármacos para tratamiento de enfermedades relacionadas con desórdenes mitocondriales como es el síndrome MELAS. De hecho, los documentos D01 y D02 anticipan métodos y modelos para este fin; sin embargo, las características técnicas que presentan no coinciden con las reivindicadas en la presente invención.

Por otra parte, el documento D03 se refiere a la cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, mutante A14G, y a su posible uso para estudios de patologías relacionadas con mutaciones del ADN mitocondrial como es el síndrome MELAS, sin embargo en este documento no se menciona un método de *screening* para selección de productos para combatir dicha enfermedad.

La presente invención se refiere a un método de *screening* para la identificación y evaluación de la eficacia de fármacos para tratamiento de enfermedades que cursan con disfunción mitocondrial y/o síndromes de MELAS que consta de dos fases de selección o cribado de fármacos, lo que no ha sido encontrado en el estado de la técnica, por lo que se considera que los documentos D01-D03 no son relevantes a efectos de la valoración de la novedad y actividad inventiva de la presente solicitud internacional.

En consecuencia, las reivindicaciones 1-4 cumplen el requisito de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986).