

## Detalles del Programa de Paratek

### Derivados de Tetraciclina que Corrigen el Empalme del SMN2.

El interés de Paratek Pharmaceuticals en desarrollar un pequeño programa en el área de la terapéutica para la Atrofia Muscular Espina (AME) comenzó en el año 2002 cuando una parte de la biblioteca de Paratek compuesta por más de 2.000 derivados modificados de Tetraciclina (TC) fueron puesto a prueba en un ensayo in-vitro relacionado a AME.

El concepto inicial para realizar pruebas con los derivados de TC para AME provino de la similitud estructural con la Aclarubicina A (ver Figura 1). Se informó en el año 2001 que esta droga quimioterapéutica resultó ser activa en ensayos relacionados a AME.

- incrementó la inclusión del exón 7 en el empalme del ARN pre-mensajero del SMN2 (ARNpre-m); y
- restituyó los niveles de proteína del SMN en las líneas celulares de un paciente con AME.

Sin embargo, la Aclarubicina es tóxica y no es apropiada para el desarrollo clínico. Paratek conjeturó que los derivados de TC no tóxicos podrían potencialmente incrementar la producción del ARNm de longitud total y la síntesis de proteína del SMN en el gen SMN2. El descubrimiento de un derivado de TC no tóxico sería un hallazgo importante que conduciría a un tratamiento potencial de AME.

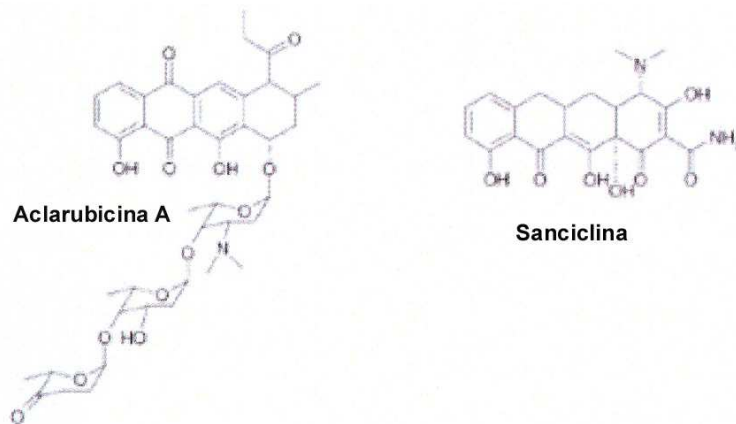


Figura 1. Comparación Estructural de Aclarubicina con los Derivados de Tetraciclina de Paratek

El SMN2 no logra compensar la mutación del SMN1, por consiguiente tampoco puede evitar se desarrolle AME, porque su ARNm pasa por empalme alternativo para codificar una proteína del SMN inestable, conocida como  $\Delta 7$ SMN.

Después de la transcripción de un gen en su correspondiente ARN pre-mensajero (ARNpre-m), la maquinaria de empalme nuclear es responsable del procesamiento de aquel ARNpre-m en su correspondiente ARN mensajero (ARNm) mediante la eliminación de intrones (fragmentos del ARNpre-m innecesarios para la síntesis de proteína) y de la

unión de exones (fragmentos de codificación de ARNpre-m necesarios para la síntesis de proteína). En pacientes con AME, la producción atípica de  $\Delta 7$ SMN truncada se debe a que el exón 7 es saltado durante el proceso de corte y empalme del ARNpre-m del SMN2. A raíz de esto, las cantidades de proteínas del SMN de largo total son insuficientes y por consiguiente las funciones motoras disminuyen. Por lo tanto, el gen SMN2 es un objetivo ideal para lograr que mediante la intervención de una droga se induzca la síntesis normal de la proteína SMN en pacientes con AME.

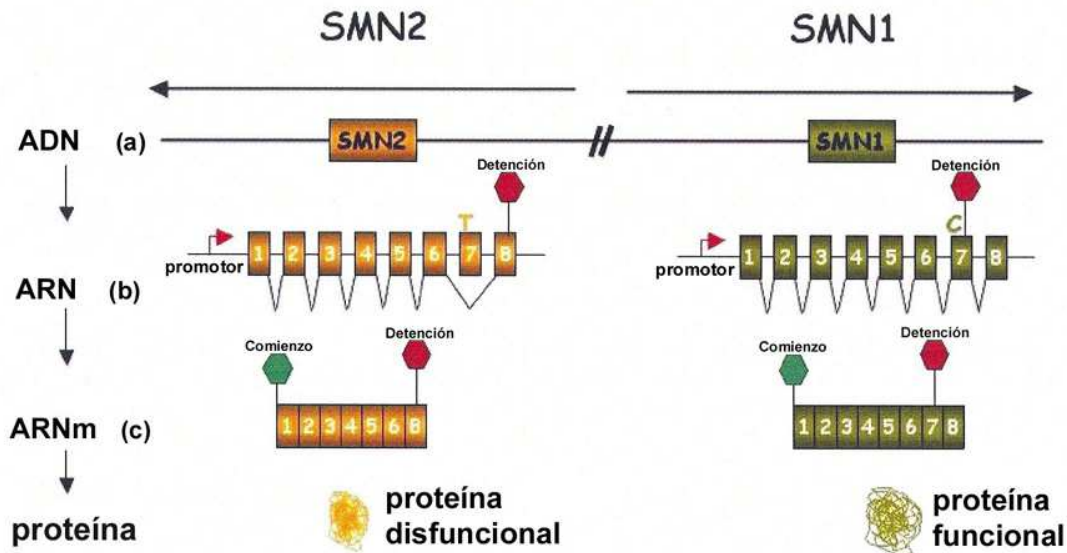


Figura 2. Empalme de los Genes SMN.

La diferencia mayor entre las dos copias del gen SMN es el cambio nucleótido C (SMN1) o T (SMN2) en el exón 7 del ADN que comprende a ambos genes. Debido a esta diferencia, el SMN2 mayormente realiza ARNm que excluye al exón 7 y produce una proteína SMN inestable y pequeña, mientras que el SMN1 realiza ARNm que incluyen al exón 7 y produce proteína SMN de largo total estable. Esto se debe a un defecto en el empalme del ARNm causado por el cambio nucleótido T en el SMN2. Abajo se explica este proceso.

(a) La organización del gen SMN1 y SMN2 en el cromosoma 5.

(b) Los genes SMN son activados por sus respectivos promotores (regiones no codificantes del gen que trabajan para activar y desactivar los genes) en un proceso llamado transcripción. Activar un gen (transcripción) da como resultado un mensaje primario de ARN el cual contiene una codificación intermedia desde la cual eventualmente se pueden producir proteínas específicas.

(c) El mensaje primario del ARN debe ser entonces procesado mediante un proceso llamado de corte y empalme del ARN, para poder así convertirse en una codificación provechosa para la producción de proteína. El proceso de corte y empalme del ARN elimina los trozos de ARN del mensaje primario, los cuales no forman parte de la

codificación de la proteína. Las regiones no codificadas que deben ser eliminadas se llaman intrones. Las regiones codificantes se llaman exones. El proceso de corte y empalme da como resultado el mensaje final ARNm el cual es la codificación de proteína contigua. El mensaje ARNm final que resulta es utilizado como molde para la producción de proteína en un proceso llamado traducción.

Las terapias que incrementan específicamente la inclusión del exón 7 dentro del ARNm del SMN2 son proclives a ser tratamientos efectivos, inclusive para pacientes de Tipo I severo de AME.

Con el apoyo de Families of SMA y con la colaboración del equipo del Profesor Adrian Krainer en Cold Spring Harbor Laboratory en NY para pruebas in-vitro, se pusieron a prueba varios de los derivados de TC de la librería de compuestos existentes en Paratek. Entre los varios "compuestos acierto", surgió el PTK-SMA1 como el más prometedor. Cuando fue incubado en extractos nucleares de células HeLa, el PTK-SMA1 mostró un incremento de 2.6 en el porcentaje de la inclusión del exón 7 durante el empalme del ARNm del SMN2.

Los mismos compuestos de prueba fueron evaluados con la colaboración del Profesor Arthur Burghes en Ohio State University en un ensayo de célula completo el cual observa la concentración de proteína SMN de largo total, en estudios nucleares llamados "Gems". En este ensayo, PTK-SMA1 mostró resultados prometedores con un incremento de 8.3 veces en los niveles de proteínas SMN en las líneas celulares de fibroblastos de pacientes con AME Tipo I. Además, PTK-SMA1 nuevamente incrementó los niveles de proteína SMN en los mismos fibroblastos de líneas celulares de pacientes cuando fueron visualizadas mediante el análisis Blot Western.

Mientras una evaluación más exhaustiva del PTK-SMA1 se está llevando a cabo en modelos animales con AME con ratones adultos heterocigotas transgénicos que expresan el gen SMN2 humano, los químicos medicinales de Paratek pudieron sintetizar más de 30 derivados, 13 de los cuales mostraron actividades similares a las del PTK-SMA1 en el ensayo del empalme del exón 7.

Paratek Pharmaceuticals, respaldada por su pericia y cobertura de propiedad intelectual en el área de modificaciones químicas de las moléculas de Tetraciclina, se encuentra en una posición en la que puede perfectamente implementar un proyecto de desarrollo de droga para el tratamiento de AME. Además de demostrar el incremento en los niveles de proteína SMN en un modelo de AME in vivo, los objetivos de Paratek también incluyen la optimización del perfil farmacocinético de todas las propiedades similares a la droga del compuesto principal seleccionado con el objeto de desarrollar moléculas de un candidato para el tratamiento de AME en los años venideros.