

**Título:** MOLECULAR THERAPY IN PRIMARY HYPEROXALURIA TYPE 1

**Nombre:** Martín Higuera, Cristina

**Universidad:** Universidad de La Laguna

**Departamento:** Anatomía, anatomía patológica, histología y fisiología

**Fecha de lectura:** 23/06/2017

**Programa de doctorado:** Programa Oficial de Doctorado en Ciencias Biomédicas

**Dirección:**

> **Director:** EDUARDO SALIDO RUIZ

**Tribunal:**

> **presidente:** ARMANDO TORRES RAMIREZ

> **secretario:** Miguel Xavier Jesus Josefats Fernandes

> **vocal:** BELEN PEREZ GONZALEZ

**Descriptores:**

> CIENCIAS MEDICAS

> NEFROLOGIA

> DISEÑO SINTESIS Y ESTUDIO DE NUEVOS FARMACOS

> BIOLOGIA MOLECULAR

**El fichero de tesis** ya ha sido incorporado al sistema

> 337128\_965718.pdf

**Localización:** MOLECULAR THERAPY IN PRIMARY HYPEROXALURIA TYPE 1

**Resumen:** Primary Hyperoxaluria type 1 (PH1) is a rare inherited metabolic disease characterized by an elevation on the oxalate excreted through the urine due to the deficiency to detoxify glyoxylate by the liver-specific protein AGT. Accumulation of insoluble calcium oxalate crystals in the kidneys impairs renal function, leading to the necessity of double liver-kidney transplantation to completely cure the disease. Molecular therapies have risen as new strategies to slow down, or hopefully, to reverse the hyperoxaluric phenotype. We hypothesized that substrate reduction therapy (SRT) through glycolate oxidase inhibition by small molecules could serve as a new approach for the treatment of PH1. First, we validated this target using knockout mice for Hao1 gene, and in double knockout mice Agxt1<sup>-/-</sup>Hao1<sup>-/-</sup>. We found that, when lacking expression of both proteins, urinary oxalate significantly decreases while increasing urinary glycolate levels, totally harmless for the animals. We purified and kinetically characterized the enzyme mouse glycolate oxidase (mGO), even in the presence of four GO inhibitors already described for its orthologues. Due to their good inhibition profile, we selected CDST and CCPST as our reference compounds to treat Agxt1<sup>-/-</sup> primary mouse hepatocytes in culture, obtaining that both compounds efficiently decrease excreted oxalate. We confirmed that CCPST enters into the hepatocytes, and its inhibition is specific to GO. Oral administration to Agxt1<sup>-/-</sup> mice, the animal model of PH1, of

CCPST at physiological pH yielded significant reduction of 30 % of urinary oxalate, with a parallel increase on urinary glycolate, confirming that SRT by inhibition of GO is a feasible treatment in vivo. Mice tolerated CCPST well, which showed high oral bioavailability in pharmacokinetic studies. However, the high doses administered saturate the hepatic metabolism of drugs, showing a non-linear pharmacokinetic profile. In collaboration with an Organic Chemistry group, we designed, synthesized and biologically tested 200 small molecules, classified in 9 structural families, for assessment of their potency on mGO inhibition and their efficacy on the in vitro model of PH1. We found new chemical entities, belonging to furysalicylates and indole families, which are more potent and efficient than the reference compound CCPST. Structure-activity relationship studies have shed light on some chemical features that must be taken into account when discovering and developing new drugs targeting glycolate oxidase to treat PH1 through SRT strategy.

La Hiperoxaluria Primaria tipo 1 (HP1) es una enfermedad metabólica hereditaria rara, que se caracteriza por una elevada excreción de oxalato en orina debido a la deficiencia en la detoxificación del glioxilato por la proteína AGT, específica del hígado. La acumulación de cristales de oxalato cálcico daña la función renal, con la única opción curativa posible del doble trasplante de hígado y riñón. Las terapias moleculares han surgido como nuevas estrategias para disminuir, o incluso, revertir el fenotipo hiperoxalúrico. Nuestra hipótesis plantea que la terapia de reducción de sustrato, mediante la inhibición de la enzima glicolato oxidasa (GO), puede servir como un nuevo mecanismo para tratar esta enfermedad. Hemos validado la diana usando animales deficientes en GO (Hao1<sup>-/-</sup>) y en simultaneidad con AGT (Agxt1<sup>-/-</sup>Hao1<sup>-/-</sup>), encontrando que la falta de expresión de ambas proteínas reduce el oxalato excretado en orina, con una elevación paralela del glicolato urinario, sin causar efectos adversos. Se purificó la enzima glicolato oxidasa de ratón y se caracterizó su cinética enzimática, tanto aislada como en presencia de cuatro inhibidores descritos para algunos ortólogos de GO. Dado el buen perfil de inhibición, seleccionamos CDST y CCPST como los inhibidores de referencia para tratar los hepatocitos primarios en cultivo aislados de ratones Agxt1<sup>-/-</sup>, obteniendo que ambos compuestos reducen de manera eficaz los niveles de oxalato excretados. Además, confirmamos que CCPST entra al espacio intracelular de los hepatocitos, y que su inhibición es específica contra GO. La administración oral de CCPST a pH fisiológico en ratones Agxt1<sup>-/-</sup>, el modelo murino de HP1, redujo significativamente los niveles de oxalato en orina en un 30%, con un incremento paralelo en los niveles de glicolato en orina, confirmando así que la terapia de reducción de sustrato mediante la inhibición de GO es un tratamiento factible in vivo. Los animales toleraron bien el CCPST, el cual mostró una alta biodisponibilidad oral en estudios farmacocinéticos. Sin embargo, las altas dosis administradas saturan el metabolismo hepático de fármacos, mostrando un perfil farmacocinético no lineal. En colaboración con un grupo de Química Orgánica, hemos diseñado, sintetizado y testado 200 moléculas de pequeño tamaño, clasificadas en 9 familias estructurales, para probar su potencia inhibiendo la GO de ratón y su eficacia en el modelo in vitro de HP1. Hemos encontrado nuevas entidades químicas, pertenecientes a las familias de los furilsalicylates y los derivados del indol, con mayor potencia y eficacia que el compuesto de referencia CCPST. Los estudios de relación estructura-actividad nos han aportado información sobre algunas características químicas que se deben tener en cuenta durante el proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos contra la GO para tratar la HP1 según la terapia de reducción de sustrato.