



## Actualización de la investigación patrocinada por la AHC

15 de enero de 2023

### **La subvención CZI de 1.000.000 de dólares es una gran noticia. ¿Qué financia?**

La subvención CZI apoya el proyecto de edición genética del laboratorio de David Liu en el Instituto Broad del MIT y Harvard. Nos permite ampliar los estudios en ratones con el equipo de la Dra. Cat Lutz en el Jackson Laboratory (Jax), diseñar estrategias de edición genética para mutaciones adicionales e integrar la investigación en ciencias básicas del laboratorio de la Dra. Kathleen Sweadner en Mass General Brigham-Harvard de una forma nueva y más completa.

La subvención del CZI supone un enorme respaldo al proyecto de edición genética. Las fundaciones de la AHC seguirán colaborando en el proyecto ampliado gracias a la subvención.

**¿Hay nuevos proyectos?** Acabamos de iniciar un nuevo proyecto con el Dr. Steve Clapcote, de la Universidad de Leeds, en el Reino Unido, para investigar la posibilidad de utilizar antagonistas de la ouabaína endógena como terapia para la AHC.

A principios de este año, financiamos un proyecto con el laboratorio del Dr. Al George, de la Universidad Northwestern, para investigar los efectos de los oligonucleótidos antisentido (ASO).

**¿Qué proyectos actuales continúan?** El proyecto AAV se reanuda con un piloto adicional en Jax en los próximos meses, utilizando un modelo de ratón mejorado de AHC. El Dr. Al George sigue probando terapias con AAV y ASO en neuronas derivadas de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) de pacientes. Se ha ampliado el proyecto de edición de genes. El trabajo de ciencia básica en curso de la Dra. Kathy Sweadner también ha proporcionado información adicional sobre la disfunción celular altamente específica de diferentes mutaciones; sus hallazgos se incorporarán al proyecto de edición de genes.

**¿Ha habido algún hallazgo crítico este año en la investigación patrocinada?** Sí. Ha habido dos hallazgos prometedores en dos proyectos diferentes del laboratorio del Dr. Al George en Northwestern:

El primero se refiere a la eficacia del vector para el **proyecto AAV**: El laboratorio del Dr. George descubrió que el vector tenía éxito en neuronas cultivadas. Las neuronas derivadas de iPSC de pacientes con AHC "tratadas" con el vector terapéutico superaron su defecto en la función de bomba y recuperaron su función normal. Esta prueba de concepto en células complementa los hallazgos anteriores en ratones.

El segundo hallazgo es relevante para el uso de los ASO como terapia eficaz. El Dr. George descubrió que cuando "eliminaba" el alelo mutante, el alelo normal restante aumentaba gradualmente su expresión para compensar, restaurando finalmente los niveles normales de proteína ATP1A3 en la célula. El mecanismo de un ASO es similar al de un knockout: silencia el alelo mutante. Este hallazgo refleja el importante potencial de los ASO para tratar la AHC.

En 2022 se produjeron avances en varios proyectos existentes, así como en nuevos esfuerzos. La mayoría de los proyectos han sido patrocinados conjuntamente por las fundaciones estadounidenses, y estamos muy agradecidos por el éxito de la colaboración.

He aquí una actualización de la situación actual de cada uno de ellos:

### **1. El Proyecto AAV: Terapia génica mediada por AAV**

Caracterización de un nuevo modelo de ratón. El proyecto AAV estuvo suspendido temporalmente durante gran parte de 2022 mientras evaluábamos qué variables cambiar para nuestro cuarto estudio piloto. En los últimos meses se han producido avances significativos en la creación y caracterización de un modelo de ratón muy mejorado para los próximos experimentos.

Los problemas con la supervivencia de los ratones experimentales han plagado el proyecto y limitado el alcance de hallazgos fiables. Con sólo un puñado de ratones AHC supervivientes para su uso en pruebas de comportamiento, no pudimos alcanzar significación estadística con nuestros experimentos. Sencillamente, no podíamos determinar ni demostrar la eficacia de la terapia. Tras una cuidadosa deliberación, decidimos interrumpir el proyecto hasta que encontráramos una forma de obtener resultados más fiables.

La Dra. Cat Lutz y su equipo de Jax sugirieron cruzar nuestros ratones AHC D801N con un nuevo fondo genético para crear un modelo animal más resistente capaz de sobrevivir hasta, y a través de, las pruebas de comportamiento. De hecho, la eliminación de algunos de los problemas creados por la endogamia en la línea original ha tenido mucho éxito: hemos reducido la fragilidad de los ratones y, al mismo tiempo, se ha conservado el fenotipo robusto AHC. La nueva cepa de ratones sigue mostrando distonía en las pruebas de inmersión en agua fría, así como falta de coordinación motora. Jax ha realizado experimentos preliminares que confirman que estos dos fenotipos son robustos y totalmente penetrantes. En otras palabras, todos los animales con la mutación, pero ninguno de los animales de control de tipo salvaje, muestran el fenotipo. Al mismo tiempo, sus tasas de supervivencia han aumentado considerablemente.

En la actualidad, los esfuerzos se han centrado en caracterizar el nuevo modelo de ratón. Establecer un fenotipo claro que sirva de base experimental y comprender el nuevo modelo ha exigido esfuerzos meticulosos en Jax. Estamos trabajando con el equipo de Jax para perfeccionar sus procesos y experimentos.

El objetivo es garantizar que los problemas con el modelo de ratón dejen de ser un obstáculo para el ensayo de diversas intervenciones terapéuticas, incluidos el vector AAV, los ASO y la edición de genes.

Prueba de concepto in vitro. Aunque hemos hecho una pausa para volver a desarrollar el modelo de ratón, también hemos recibido noticias alentadoras del laboratorio del Dr. Al George. En un esfuerzo separado pero paralelo financiado por Hope for Annabel y utilizando la línea celular de Annabel, el grupo del Dr. George confirmó la eficacia del vector en el tratamiento de neuronas derivadas de iPSC.

vector en el tratamiento de neuronas derivadas de iPSC en su laboratorio de Northwestern. La función de bomba deprimida era un fenotipo consistente en las neuronas no tratadas, pero con el vector, la función de bomba aumentó a niveles normales. En otras palabras, en una placa del laboratorio del Dr. George, el vector "rescató"

Las neuronas de Annabel recuperaron su función normal. Esto resulta muy prometedor como estrategia terapéutica para todos los pacientes con mutaciones de pérdida de función, no sólo para Annabel.

Este hallazgo de "prueba de concepto" in vitro complementa los resultados dispares de anteriores experimentos de "prueba de concepto" en ratones. Ni Jax ni el laboratorio de otro equipo fueron capaces de replicar los resultados iniciales positivos, aunque limitados, de la eficacia del método AAV. StrideBio, la empresa farmacéutica que pretendía desarrollar una terapia con AAV para la AHC, dejó de trabajar cuando no pudo lograr el mismo éxito (medido). La significación estadística ha sido un problema común. Con el nuevo modelo de ratón, la eficacia del vector puede medirse con mayor claridad en ausencia de fragilidad y susceptibilidad al estrés propias de cada raza de ratón.

Ahora, con los buenos resultados obtenidos in vitro en el laboratorio del Dr. George y un nuevo modelo de ratón más sólido, está previsto que el próximo proyecto piloto de AAV comience a finales de invierno o principios de primavera.

## **2. Edición genética**

El año pasado, el laboratorio Liu del Instituto Broad del MIT y Harvard identificó con éxito una estrategia de edición genética que corrige eficazmente la mutación Atp1a3 D801N del ratón in vitro, o en células cultivadas en placa. El equipo se ha centrado ahora en dos tareas de seguimiento: la preparación para probar la edición génica en ratones in vivo y la ampliación del alcance del proyecto para considerar otras mutaciones del gen ATP1A3 humano.

Preparación para experimentos in vivo. En previsión de las pruebas in vivo de edición genética en nuestro modelo de ratón en Jax, el laboratorio Liu ha reunido un nuevo equipo de investigación multidisciplinar: La Dra. Cat Lutz, Vicepresidenta del Centro Traslacional de Enfermedades Raras y experta en ratones de gran prestigio en Jax, y la Dra. Kathleen Sweadner, una destacada investigadora centrada en la estructura fundamental y la biología de ATP1A3 en la Facultad de Medicina Mass General Brigham-Harvard, se unirán al equipo del proyecto. Juntos, el equipo combina conocimientos pioneros en edición genética, una experiencia excepcional en ensayos con modelos animales y un profundo conocimiento de la naturaleza precisa de las mutaciones específicas de ATP1A3. Se trata de un "dream team" de científicos de primera fila procedentes de campos diversos pero complementarios.

El equipo ha diseñado un plan de investigación para realizar estudios exhaustivos in vivo en ratones.

in vivo en ratones.

En los últimos meses, el laboratorio de Liu ha perfeccionado la estrategia de edición para el modelo de ratón AHC D801N con el fin de eliminar prácticamente todos los subproductos de edición deletéreos detectables in vitro. El equipo también ha realizado varios experimentos de caracterización para comprender mejor qué combinación

mejor la estrategia de edición global. Por último, el laboratorio de Liu ha producido los reactivos de edición genética AAV9 necesarios para realizar el estudio in vivo en ratones.

Antes de proceder a la siguiente fase de experimentos, Jax está completando el trabajo de caracterización del fenotipo para el nuevo modelo de ratón. (Véase más arriba.)

Mutaciones adicionales. El laboratorio Liu también ha iniciado experimentos para corregir las siguientes mutaciones humanas AHC in vitro: D801N, E815K, G947R y L839P. Estos experimentos se encuentran aún en las primeras fases de desarrollo.

Alexander Sousa, investigador principal de David Liu en el proyecto, presentó los progresos actuales del equipo a las comunidades de pacientes e investigadores de AHC en Escocia durante la reunión ATP1A3 celebrada en octubre. Esta reunión proporcionó al equipo de Liu la oportunidad de iniciar conversaciones para nuevas colaboraciones con otros investigadores de AHC.

La subvención CZI para el proyecto de edición genética. En noviembre de 2022, el laboratorio de David Liu, junto con Hope for Annabel como representante de la comunidad AHC, ganó una importante subvención competitiva de la Iniciativa Chan Zuckerberg para ampliar el esfuerzo de edición de genes. Esta subvención forma parte del esfuerzo de financiación de la Iniciativa Chan Zuckerberg Patient Partnered Collaborations, cuyo objetivo es ampliar el círculo de expertos y partes interesadas en la investigación de enfermedades raras para incluir a las organizaciones de pacientes como colaboradores en pie de igualdad con los científicos.

Además del laboratorio de Liu, el equipo de investigación del premio CZI está compuesto por el mismo grupo de colaboradores que participarán en la fase de experimentación con ratones del proyecto: La Dra. Cat Lutz, de Jax, y la Dra. Kathleen Sweadner, de Mass General-Brigham. La Dra. Kathy Swoboda, clínica jubilada muy recientemente y experta en AHC anteriormente en MGH, también se unirá al equipo para ofrecer su experiencia clínica.

La subvención de CZI nos permite financiar los esfuerzos de investigación más allá del plazo inicial de dos años que se determinó originalmente para el proyecto conjunto de edición genética Hope for Annabel-AHCF-Cure AHC. El proyecto inicial se ha ampliado para convertirse en un esfuerzo de mayor alcance financiado por el CZI.

Una adición específica al ámbito del proyecto de edición de genes en el marco de la subvención CZI es el desarrollo y la caracterización de un nuevo modelo celular de AHC en el laboratorio de Kathy Sweadner en Mass General Brigham-Harvard Medical School. Este nuevo modelo permitirá dilucidar los mecanismos moleculares e intracelulares que subyacen a los fenotipos patológicos asociados a diversas mutaciones de ATP1A3. El modelo expresará tanto copias silvestres como

mutantes del gen ATP1A3, recapitulando así los genotipos de los pacientes. También se utilizará como plataforma para probar diversas intervenciones terapéuticas con el fin de revertir la patología de la enfermedad in vitro.

El objetivo principal del proyecto CZI es "corregir las mutaciones causantes de la enfermedad AHC en el ratón D801N con la edición de genes para (1) mitigar la enfermedad y para (2) identificar la ventana óptima para la intervención terapéutica." Este es el mismo objetivo final que el premio inicial de edición de genes AHC que fue proporcionado por las tres organizaciones estadounidenses AHC en 2021. El proyecto inicial de edición genética y el proyecto CZI son esencialmente fases secuenciales en pos del mismo objetivo final, con el beneficio de un "dream team" de colaboradores científicos recién reunido.

**El valor total de la subvención asciende a 1.000.000 de dólares para un periodo de concesión de dos años, con opción a una renovación no competitiva de dos años por 1.000.000 de dólares adicionales.**

### **3. Oligonucleótidos antisentido (ASO)**

El laboratorio del Dr. Alfred George en la Universidad Northwestern ha realizado importantes progresos en una investigación de prueba de concepto de ASO in vitro, un proyecto financiado conjuntamente por cuatro organizaciones de AHC (AHCF, Cure AHC, Hope for Annabel y For Henry).

El equipo del Dr. George está investigando varias mutaciones para comprender su mecanismo y si son candidatas a diferentes enfoques terapéuticos, incluidos los ASO. Su equipo creó líneas iPSC isogénicas (es decir, con el mismo fondo genético) con corrección o delección de variantes patogénicas de ATP1A3. Las neuronas generadas a partir de estas líneas iPSC se están probando en una serie de ensayos que comparan las propiedades electrofisiológicas de una línea mutante heterocigótica, una línea isogénica corregida y una línea knock-out. Estas pruebas están diseñadas para ayudar a determinar si cada mutación tiene un mecanismo dominante negativo o de simple pérdida de función (haploinsuficiencia). La hipótesis inicial era que las mutaciones negativas dominantes serían candidatas a ASO. Los hallazgos posteriores sugieren que las mutaciones con haploinsuficiencia o con un mecanismo dominante negativo podrían obtener un beneficio terapéutico de un ASO.

**El Dr. George descubrió que cuando "eliminaba" sólo el alelo mutante del gen ATP1A3, el alelo normal aumentaba gradualmente su expresión con el tiempo para compensar.** Al eliminar el alelo mutante y conservar sólo el alelo normal, se restablecían en la célula niveles de proteína ATP1A3 comparables a los de una célula con dos copias de ATP1A3. Un "knockout", en el que el alelo mutante se elimina mediante edición genética, es una aproximación al "knockdown" de un alelo mutante que se desencadena por un ASO.

Teóricamente, podemos replicar este silenciamiento del alelo mutado en pacientes utilizando un ASO.

Aunque este experimento se realizó en neuronas de una línea celular D801N, cabe señalar que es relevante para todos los pacientes con AHC: si el alelo mutante -posiblemente de cualquier mutación- puede ser silenciado, el alelo normal sobrecompensa y restaura los niveles normales de proteína en la célula.

El importante hallazgo del Dr. George en apoyo de un enfoque terapéutico "knockout" o "knockdown" ha validado los esfuerzos iniciales para desarrollar un ASO para pacientes con AHC.

En los próximos meses, el Dr. George utilizará un ASO diseñado para eliminar el alelo mutante mediante un ASO, y su equipo evaluará la eficacia de las lecturas electrofisiológicas.

Otras colaboraciones y próximos pasos En los últimos meses, hemos explorado otras colaboraciones con algunos de los mejores científicos e instalaciones del país, como n-Lorem/Ionis y Charles River.

Pues Henry acaba de firmar un contrato con Charles River para diseñar secuencias de ASO y clasificarlas en términos de eficacia y riesgo para un paciente. (Cabe señalar que este enfoque terapéutico puede requerir un diseño de ASO específico para cada paciente, con algunas excepciones). El siguiente paso consistirá en probar los efectos de los principales ASO candidatos en neuronas derivadas de iPSC, muy probablemente en el laboratorio del Dr. George en Northwestern.

Por último, con el fin de validar aún más el potencial de un ASO como terapia para la AHC, estamos considerando una "prueba de concepto" experimento in vivo en Jax en uno de nuestros modelos de ratón. Se desarrollaría un ASO específico para ratón y se utilizaría para intentar rescatar a un ratón con AHC. Esto implicaría la misma identificación y priorización de secuencias de ASO, esta vez diseñadas en torno al ratón en lugar del paciente. En lugar de pasar a las pruebas in vitro -o posiblemente tras la validación in vitro-, los ratones serían tratados con el ASO. Los resultados serían relevantes para todas las mutaciones de AHC: ¿Morirían los ratones por un efecto tóxico imprevisto del ASO? ¿Tendría algún efecto

¿tendría algún efecto? ¿O tendría un efecto terapéutico? Aunque este ASO no funcionaría en humanos, podría ayudar a determinar si los ASO serán un tratamiento eficaz para los pacientes. Otras solicitudes de nuevos fármacos en investigación con ASO presentadas a la FDA han pasado directamente de la administración in vitro a la administración en humanos, por lo que aún estamos evaluando este paso.

#### **4. Ouabaina endógena**

AHCF, Cure AHC, y Hope for Annabel iniciaron un proyecto totalmente nuevo con el Dr. Steve Clapcote en diciembre. El Dr. Clapcote investigará la relación entre la ouabain y la Na/K-ATPasa en su modelo de ratón Myshkin de AHC en la Universidad de Leeds, en un esfuerzo por identificar un nuevo enfoque terapéutico para la AHC.

El Dr. Clapcote está realizando experimentos en sus ratones para probar la siguiente hipótesis:

1. Si la disminución de la actividad de la bomba de sodio-potasio (NKA) es el mecanismo de la AHC, el aumento de la función de la bomba debería mejorar los síntomas clínicos.
2. Los esteroides cardiotónicos endógenos (ECS), liberados en respuesta al estrés, inhiben la actividad de la NKA.
3. 3. Puede ser beneficioso reducir el efecto de los ECS como inhibidores de la NKA introduciendo un antagonista de los ECS.

Identificar un compuesto que pueda ser terapéutico para los pacientes de AHC es el objetivo central del proyecto.

El Dr. Clapcote tratará ratones con cuatro antagonistas diferentes de los inhibidores endógenos de la NKA: tres moléculas pequeñas (BD-15, rostafuroxina y compuesto 16) y un anticuerpo (DigiFab). A continuación, grabará y analizará a sus ratones en una serie de pruebas de comportamiento y cuantificará los efectos de los compuestos.

En última instancia, estos experimentos mostrarán si el tratamiento semi-agudo con cualquiera de los cuatro tratamientos antagonistas de ECS diferentes es eficaz para reducir los déficits conductuales y aumentar la actividad NKA cerebral en el modelo de ratón Myshkin de AHC. La demostración de la eficacia en el modelo de ratón identificaría el tratamiento como un enfoque terapéutico potencial que merece la pena desarrollar para trasladarlo a los pacientes con AHC.

## 5. Ciencia básica

Hope for Annabel también patrocina la investigación científica básica en el laboratorio de la Dra. Kathleen Sweadner en la Mass General Brigham-Harvard Medical School. Nos entusiasma que sus complejos y matizados hallazgos se incorporen también al proyecto de edición genética, donde quizá puedan tener una relevancia traslacional para futuras terapias. El objetivo general del trabajo de la Dra. Sweadner es predecir qué mutaciones de ATP1A3 son el mejor objetivo de la terapia génica y cuáles pueden beneficiarse de fármacos que promuevan el plegamiento de la proteína, o de estrategias alternativas.

El trabajo en curso del Dr. Sweadner ha permitido comprender la disfunción celular altamente específica de diferentes mutaciones y ha revelado una serie de consecuencias mecanicistas que se derivan de distintas mutaciones de ATP1A3. Entre ellas figuran: mal plegamiento durante la biosíntesis; fragmentación del aparato de Golgi; e internalización y pérdida hacia los lisosomas. Los nuevos hallazgos biológicos del Dr. Sweadner

del Dr. Sweadner modificaron las suposiciones existentes de que las mutaciones de ATP1A3 causan enfermedades principalmente debido a la alteración de la función de bomba de la proteína ATP1A3.

Según su trabajo, las diferencias en las respuestas celulares fundamentales a las distintas mutaciones pueden subyacer al espectro fenotípico que se observa en el gen ATP1A3. Las diferencias entre mutaciones son increíblemente importantes para identificar, comprender -y

potencialmente corregir- las fuentes específicas de disfunción. Si una mutación inactiva la Na,K-ATPasa o reduce su afinidad por un ion clave, el único recurso de una célula es ajustar la expresión de otras proteínas que podrían ayudarla a adaptarse. En ese caso, la introducción de una copia "buena" o funcional del gen, como en el enfoque AAV, resulta atractiva como terapia. Si una mutación impide que la proteína se pliegue durante la biosíntesis, es probable que se produzca agregación, lo que resulta en toxicidad, y la célula pone en marcha una serie de estrategias defensivas. Potenciar el plegamiento o las estrategias defensivas es un enfoque terapéutico alternativo. En última instancia, los fallos en la biosíntesis son puntos potenciales de intervención terapéutica: comprenderlos es fundamental.

## **Conclusión**

Las fundaciones de la AHC siguen aplicando múltiples estrategias complementarias para desarrollar terapias para la AHC. El potencial terapéutico es la prioridad de todos los proyectos de investigación que financiamos. Necesitamos que la investigación se traduzca en resultados: terapias que puedan ayudar a nuestros pacientes.

Estamos siguiendo múltiples vías de investigación para cubrir tantas bases como sea posible. Con tantas mutaciones causantes de la enfermedad en la AHC, algunos pacientes pueden beneficiarse de ciertos enfoques terapéuticos, mientras que otros pueden requerir una estrategia diferente.

Seguimos aumentando nuestra cartera de proyectos prometedores, con una combinación de urgencia y prudencia. El tiempo pasa deprisa para nuestros niños, y somos conscientes de la necesidad de avanzar rápidamente, al tiempo que empleamos los fondos con cautela.

Nos complace ver la colaboración entre tantos científicos, en múltiples disciplinas y proyectos. La reunión ATP1A3 de octubre en Edimburgo fue un catalizador enorme para la colaboración y el entusiasmo en la comunidad, y esperamos seguir avanzando a medida que nos acercamos a

2023.

Creemos que estamos persiguiendo los mejores enfoques terapéuticos identificados para la AHC, desde la medicina genética hasta el cribado de fármacos. Como comunidad, seguimos trabajando juntos para defender el futuro de nuestros pacientes y seres queridos.