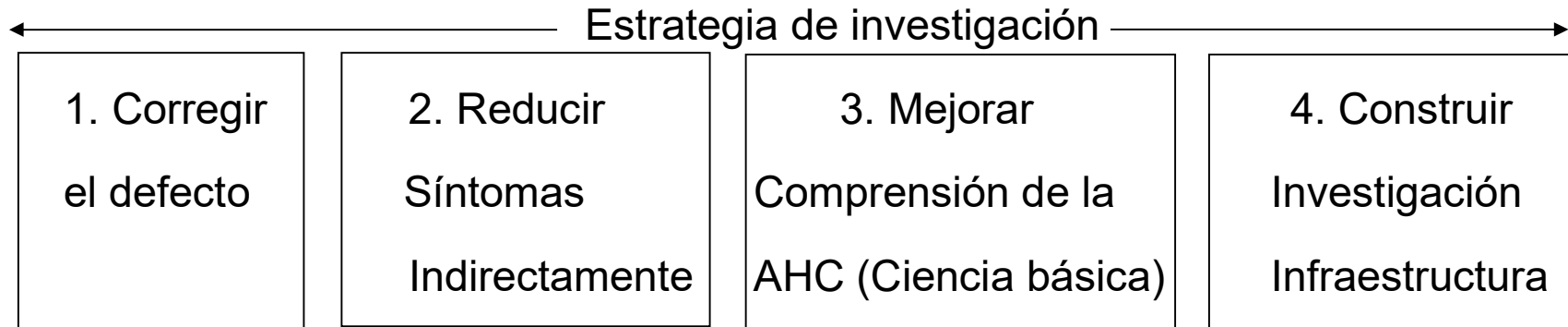


Actualización de la investigación: agosto de 2023

Perspectivas generales e informes de situación de los proyectos en curso



Nuestra cartera de terapias financia la investigación a través de múltiples estrategias.



1. Corregir la fuente de la disfunción de ATP1A3 podría eliminar los síntomas del paciente.
2. Los objetivos indirectos pueden abordarse para reducir el efecto de neuronal, mejorando los síntomas del paciente.
3. Esfuerzos multidisciplinarios para dilucidar el mecanismo vías y bioquímica pueden descubrir nuevas líneas de investigación, identificar nuevas oportunidades oportunidades de tratamiento.
4. Un conjunto de herramientas de investigación que incluyen modelos celulares, datos pacientes y marcadores diagnóstico, ayuda a investigadores en múltiples proyectos.

Los proyectos pertenecen a cada una de estas cuatro categorías

1. Estrategias para "corregir el defecto"

1. Editar

Elimine el ADN incorrecto y sustituirlo por secuencia corregida

Edición genética

2. Over-compensar

Proporcionar genes funcionales para complementar la función normal y diluir la disfunción

Terapia génica
mediada por AAV

2. Silenciar

Silenciar un gen mutado para eliminar los efectos tóxicos

Oligonucleótidos
antisentido (ASO)

Estamos utilizando tres estrategias diferentes para incidir en el mecanismo genético de la
AHC

Corregir
el defecto

Edición genética (David Liu, CZI Grant)

Resumen del proyecto

Estrategia terapéutica: ¿Cómo funciona?

El laboratorio Liu utiliza la edición primaria y la edición de bases para realizar mutaciones genéticas en el ADN, sustituyendo un nucleótido patógeno mutado por otro correcto.

- Un ARN guía (ARNg) y un ARN guía de edición primaria (ARNpeg) que contienen instrucciones genéticas.
- En el interior de la célula, Cas9 se une al ARNg y al ARNpeg, formando un complejo. El ARNg guía al complejo hasta el sitio diana en el genoma, mientras que el pegARN transporta instrucciones genéticas.
- El complejo de edición primaria realiza una serie de reacciones bioquímicas en el lugar de destino: esto genera una muesca en una de las cadenas de ADN. La plantilla de pegARN codifica instrucciones para una inserción, delección o sustitución.
- Los mecanismos naturales de reparación del ADN de la célula finalizan las modificaciones: se incorporan los cambios genéticos.
- La edición genética modificaría de forma permanente el ADN de un paciente.

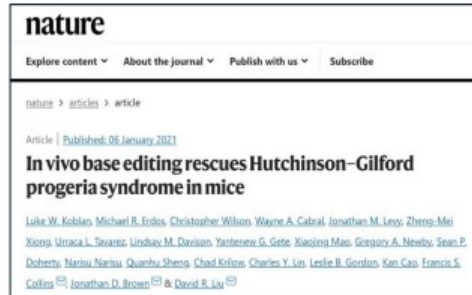
¿Qué sería un Tratamiento para pacientes?

- ✓ Una sola vez tratamiento
- ✓ Mutación específica
- ✓ Cuatro ATP1A3 mutaciones actualmente como objetivo: D801N, E815K, G947R (mutaciones G→A y G→C) y L839P
- ✓ Terapia es desconocida.

Corregir
el defecto

Edición genética (David Liu, CZI Grant)

El trabajo pionero del laboratorio Liu en edición genómica rescató modelo de ratón de la progeria ("Yo soy Sam")



- Nuestro proyecto de edición genética con éxito en la primera fase (V1) resultaron muy prometedores: en la V2 se ha seguido optimizando
- El proyecto se financia con una subvención de 2.000.000 de dólares de la Iniciativa Chan Zuckerberg
- El proyecto se centra en 4 mutaciones de la AHC D801N, G947R, E815K y L839P: el laboratorio Liu diseñó y evaluó cientos de estrategias de corrección para cada una
- Se ha empezado a probar en ratones D801N la estrategia de edición del gen V1.
- Los ratones fueron inyectados al nacer; a las 4 semanas se recogerá tejido para ADN; a continuación se realizarán pruebas de comportamiento.
- La siguiente fase, las pruebas en células pacientes, comenzará este verano en la University

Los resultados de los experimentos in vitro se acercan al "mejor de los casos" para el laboratorio Liu, con una alta tasa de corrección y una tasa de error mínima

Corregir
el defecto

Terapia génica mediada por AAV (Laboratorios Jackson)

Resumen del proyecto

Estrategia terapéutica: ¿Cómo funciona?

El concepto del proyecto de terapia génica mediada por AAV consiste en gen ATP1A3 a las neuronas del paciente. El objetivo es mejorar la funcionalidad de las neuronas aumentando la cantidad de bombas funcionales en la célula.

- Un gen ATP1A3 con mutaciones asociadas a la AHC codifica una proteína ATP1A3 disfuncional. Estas proteínas mutadas no funcionan correctamente y alteran la función de la bomba de sodio-potasio.
- La adición de copias funcionales adicionales del gen ATP1A3 podría diluir el efecto deletéreo de la copia mutante del gen.
- Se ha diseñado un vector viral que contiene ADNc de ATP1A3 para liberar su carga útil en las neuronas.

ATP1A3 a las neuronas. El ATP1A3 es transcrito y la maquinaria celular, produciendo una proteína funcional.

- Un tratamiento único está diseñado para entregar copias del gen que permanezcan en las neuronas durante años y produzcan copias funcionales de la proteína ATP1A3.

¿Qué sería un Tratamiento para pacientes?

- ✓ Una sola vez tratamiento
- ✓ Vía de administración tbd
- ✓ Todos los pacientes con AHC con mutaciones pueden beneficiarse del vector actual
- ✓ La ventana terapéutica es desconocida

Corregir
el defecto

Terapia génica mediada por AAV (Laboratorios Jackson)

- Después de que problemas con el modelo de ratón retrasaran el proyecto, el concepto fue in vitro en neuronas iPSC (L839P) en el laboratorio del Dr. Al George en Northwestern.

- Los preparativos para la siguiente fase del proyecto AAV han estado en marcha

- Jax ha pasado los últimos 8 meses moviendo el modelo de ratón de mutación D801N AHC a un nuevo, más robusto fondo genético y caracterizarlo

- Los fenotipos han seguido siendo penetrantes y los ratones ya no son extremadamente vulnerables a la muerte súbita

- El nuevo estudio comenzará este verano

- En el estudio participarán 140 ratones.

- El plan de fenotipado de Jax incluye peso corporal, supervivencia, HID, rotarod y campo abierto

- Los primeros datos sobre un posible rescate se esperan a partir de diciembre/enero

Jax ha llevado a cabo un extenso trabajo de caracterización en el nuevo modelo de ratón, sin coste alguno para las fundaciones de la AHC sin coste alguno para las fundaciones de la AHC; el estudio del AAV también se proporciona gratuitamente

Corregir
el defecto

Oligonucleótidos antisentido (ASO)

Resumen del proyecto

Estrategia terapéutica: ¿Cómo funciona?

Un ASO está diseñado para mejorar los síntomas de un paciente al minimizando los efectos nocivos de un alelo mutante.

- Los pacientes con AHC (con mutaciones ATP1A3) tienen una copia buena y una copia mala ("alelos") de ATP1A3.
- Los datos preliminares sugieren que silenciar la copia mala (o alelo mutante) y dejar intacta la copia buena proporcionará beneficio terapéutico en la AHC.
- Los ASO están diseñados para actuar sobre el ARNm mutante, unirse a él y marcarlo para su degradación, "eliminando" los niveles de ARNm y proteína mutados.
- Los ASO para la AHC pueden diseñarse para atacar la mutación causante de la enfermedad mutación o no patógena SNPs (o variantes) en un paciente ATP1A3 ARNm del paciente.
- Un ASO diseñado contra una mutación específica puede utilizarse para todos los pacientes con esa mutación específica; un ASO diseñado contra SNP no patógenos también puede funcionar en múltiples pacientes.

¿Qué sería un Tratamiento para pacientes?

- ✓ Administración estimada cada 6 meses después inicial
- ✓ Vía de administración administración por punción lumbar
- ✓ Específica de la mutación o específica del paciente
- ✓ La ventana terapéutica es desconocida



Oligonucleótidos antisentido (ASO)

Para Henry AHC y las Fundaciones AHC:

Una colaboración para las OAA

- Para Henry AHC ha estado persiguiendo una terapia ASO para Henry Saladino, con el apoyo y la aportación de las fundaciones de AHC
- En los meses anteriores, Charles River diseñó ASO dirigidos a los SNP de Henry y los clasificó en términos de riesgos de unión fuera del objetivo y fuerza de recocido (especificidad alélica).
 - Los mejores ASO candidatos se sintetizaron comercialmente y el Dr. Al George los está probando en las neuronas iPSC de Henry para determinar la eficacia de cada uno.
- El mes pasado, recibimos la noticia de que el Dr. Tim Yu, que se especializa en ASOs en el Boston Children's Boston Children's Hospital, ha aceptado nuestro proyecto ASO y dirigirá el trabajo preclínico para nosotros en el futuro.
- El proyecto empezará con el genotipo de Henry Saladino, pero el objetivo es que se amplíe para incluir a otros pacientes que podrían ser tratados con el ASO, ampliándolo lo más posible mientras se teniendo en cuenta riesgos, costes, plazos y recompensas.
- A lo largo del próximo mes, trabajaremos para desarrollar y aprobar un contrato que defina los un buen equilibrio entre un proyecto "para Henry AHC" y un esfuerzo "comunitario", con el fin de que beneficie a todas las partes.

Nuestra esperanza es que el proyecto con Tim Yu conduzca a una metodología de medicina de precisión a escala para la AHC.

Corregir
el defecto

Oligonucleótidos antisentido (ASO)

ASO Justificación
Proyecto

- El Dr. George sigue trabajando en el proyecto ASO Rationale
- Estamos esperando datos del Dr. George de las neuronas iPSC E815K y L839P sobre el mecanismo compensatorio que observó en D801N ("knock out" del alelo mutante resultó en la restauración de niveles "normales" de proteína ATP1A3 en la célula) opción terapéutica para otras mutaciones.
- El Dr. George también ha estado probando ASO diseñados contra la mutación patógena en D801, y también estamos esperando sus resultados.
- Para Henry AHC está cofinanciando este esfuerzo junto con AHCF, Cure AHC y Hope for Annabel

Mouse P.O.C.

- Estamos colaborando con Cat Lutz (Jax) y el científico de ASO Brian Bettencourt para demostrar la eficacia terapéutica de un ASO "óptimo" en nuestro modelo de ratón.
- Se han diseñado ASOs para eliminar el alelo mutante en el modelo de ratón D801N B6/CAST; se sintetizarán y evaluarán in vitro antes de las pruebas in vivo en Jax

Estamos discutiendo asociaciones con científicos de la ASO para avanzar en este esfuerzo,
incluyendo a Tim Yu en Harvard/Boston Children's

2. Estrategias para "reducir los síntomas indirectamente"

1.	Inhibir Otros Inhibidores	Eliminación de otros compuestos inhibidores podría potenciar la función de la bomba.	Inhibidores endógenos de la Ouabaína
2.	Nueva Estrategia	Investigación de una estrategia que eliminara los efectos Celulares y podría ser terapéutica para los pacientes	Nuevo proyecto en desarrollo
3.	Inhibir Otros Inhibidores	Confirmación de un mecanismo presente en otras enfermedades en la AHC podría conducir a nuevas estrategias de intervención	Nuevo proyecto en desarrollo

El proyecto sobre inhibidores endógenos de la uabaína está en marcha.

estamos desarrollando investigaciones en las otras áreas

Reducir los síntomas
indirectamente

1. Antagonistas endógenos de la Ouabaína

Resumen del proyecto

Estrategia terapéutica: ¿Cómo funciona?

La premisa detrás de este esfuerzo es "inhibir un inhibidor" de la bomba de sodio potasio.

- La bomba de sodio-potasio suele estar alterada en la AHC.
- Otros compuestos naturales también interactúan con esta bomba y pueden afectar o reducir su función.
- Uno de ellos es la ouabaína endógena, un esteroide cardiotónico.
- Se sabe que la sobreestimulación o la sobreexposición a factores estresantes provocan la liberación de ouabaína endógena, que bloquea la función normal de la bomba NKA.
- La hipótesis tiene relevancia clínica: el estrés o los "desencadenantes" pueden provocar episodios en los pacientes
- Inhibir la ouabaína endógena podría ser beneficioso para la función de la bomba.
- Los ensayos en ratones evaluarán si la reducción de los efectos inhibidores de la ouabaína endógena tiene beneficios terapéuticos.

¿Qué sería un Tratamiento para pacientes?

- ✓ Administración repetida/crónica
- ✓ Vía de administración: probablemente sistémica
- ✓ Todas las mutaciones en ATP1A3 pueden beneficiarse
- ✓ Beneficios desconocidos para no ATP1A3
- ✓ Puede beneficiar a todas las edades pero ventana terapéutica sin confirmar

Reducir los síntomas
indirectamente

1. Antagonistas endógenos de la Ouabaína

- El Dr. Steve Clapcote está utilizando ratones para investigar el uso de antagonistas de esteroides cardiotónicos endógenos como estrategia terapéutica para la AHC.
- El laboratorio del Dr. Clapcote está probando en ratones cuatro compuestos diferentes: tres pequeños (BD-15, rostafuroxina y compuesto 16) y un anticuerpo (DigiFab).
- La rostafuroxina y el DigiFab podrían reutilizarse para la AHC de forma acelerada: ambos han sido evaluados o aprobados por la FDA.
- Se han iniciado ensayos conductuales en ratones WT y het tratados con BD-15
- El Dr. Clapcote colabora con el equipo de Jax: los experimentos se discuten y los resultados se comparten entre proyectos.
- Se esperan resultados en otoño e invierno
- La evaluación de la eficacia en el modelo de ratón tiene por objeto determinar si los inhibidores de la ouabaína endógena podrían ser una estrategia terapéutica para los pacientes con AHC.

Crear una infraestructura de investigación

La inversión en herramientas para investigadores respalda los esfuerzos en los proyectos actuales y nos ayuda a prepararnos para futuros ensayos clínicos.

Investigación

Infraestructura

C.elegans

Modelos animales y celulares

- La Dra. Anne Hart (Brown University) diseñará un modelo de gusano (C. elegans) para 3 mutaciones AHC diferentes: D801N, L839P, y E815K
- Un modelo de gusano de AHC proporcionaría un modelo in vivo más simple y ampliamente estudiado para permitir el desarrollo de futuros fármacos y pequeñas moléculas; los modelos actuales en ratones no son adecuados para esta aplicación.
- Este modelo permite realizar comparaciones entre genotipos, tanto al inicio como después de una intervención "terapéutica"

Ratón "humanizado"

- Los laboratorios Jackson están creando un modelo de ratón "humanizado" por una secuencia de ADN humano igual a la del paciente.
- El ratón humanizado se utilizará para probar múltiples terapias y clínicamente relevantes para predecir la eficacia de los tratamientos.
- Jax está generando este modelo sin coste alguno

Neuronas y modelos celulares

- Las neuronas derivadas de iPSC han sido estudiadas y probadas por el Dr. Al George (Northwestern) para identificar un fenotipo de referencia.
- En ellas se están evaluando estrategias terapéuticas: El Dr. George ha demostrado la eficacia de la estrategia de terapia génica mediada por AAV en neuronas iPSC y empezará a probar la eficacia de la edición de genes.
- La Dra. Kathleen Sweadner ha evaluado modelos celulares de múltiples mutaciones de AHC en el laboratorio de la Dra. Kathleen Sweadner se han evaluado modelos celulares de múltiples mutaciones AHC.

Los modelos establecidos y caracterizados de genotipos de AHC están diseñados para motivar a los científicos a utilizarlos: queremos que la AHC sea un "blanco fácil"

Investigación

Infraestructura

WGS, datos de pacientes y biomarcadores

Genoma completo. Secuenciación

- Estamos creando una coalición WGS con Illumina y Gene DX con dos objetivos principales:
 - Financiación de WGS a través de Medicare para todas las enfermedades raras
 - Recopilación y centralización de datos como base para el genotipo, -ómica, fenotipo, clínica y correlación de datos PRO.
- Estos datos fundacionales son críticos para identificar dianas terapéuticas para todas las enfermedades raras; la genética de base puede proporcionar pistas en AHC

Historia natural

- El objetivo es seguir a los pacientes longitudinalmente, evaluando los síntomas y recoger muestras biológicas, para seguir la progresión / variabilidad de la enfermedad a lo largo del tiempo, a la vez que se incorporan las aportaciones de los pacientes, las opiniones de los expertos de la AHC y las mejores prácticas de estudios de historia natural anteriores y paralelos de la AHC
- Se están llevando a cabo otros estudios paralelos de historia natural, pero el acceso a los datos puede ser limitado

Biomarcador. Investigación

- También buscamos biomarcadores que se correlacionen con la AHC.
- Los biomarcadores son una valiosa medida objetiva de la eficacia del tratamiento en los ensayos clínicos; también podrían ayudar a los médicos a diagnosticar nuevos pacientes de AHC la variabilidad o progresión de la enfermedad
- La investigación de biomarcadores puede ser costosa: es probable que nuestro enfoque se base en hipótesis, utilizando los resultados de otros estudios clínicos de otras enfermedades relacionadas como pistas

Los datos de los pacientes pueden ser muy valiosos, sobre todo para la preparación de los ensayos clínicos, si son polifacéticos y están correlacionados entre sí.

Nuevos proyectos de investigación

Actualmente estamos desarrollando 4 nuevos proyectos piloto para investigar estrategias para la AHC. Se basan en los siguientes conceptos:

1. Utilizar el conocimiento ampliado de los fenotipos celulares de la AHC y mecanismos para identificar dianas terapéuticas y terapéuticos.
2. Aprovechar los avances en campos adyacentes.
3. Utilizar los modelos existentes de nuevas formas.

Explorar nuevas estrategias terapéuticas es factible porque los costes son bajos para en las primeras fases; la multiplicidad de enfoques maximiza las probabilidades de éxito.