

## **Desarrollo de una nueva variante de Frataxina (FXN) como candidata a terapia de reemplazamiento proteico para la Ataxia de Friedreich.**

El presente proyecto tiene como **principal objetivo** el desarrollo de una nueva proteína candidata a **fármaco de terapia de reemplazamiento para la enfermedad ataxia de Friedreich (AF)** con una distribución al sistema nervioso central (SNC) mejorada.

Recientemente, un análogo de FXN, **nomlabofusp** (CTI-1601), formado por un péptido que penetra en las células (CPP, del inglés *cell-penetrating peptide*), y la secuencia de FXN, ha sido evaluado en ensayos clínicos de fase I (NCT04176991) y fase II (NCT06447025).<sup>1,2</sup> Los resultados del primer ensayo clínico mostraron cantidades superiores de FXN en piel, células bucales y sangre.<sup>1</sup> Sin embargo, todavía no hay datos sobre su capacidad para cruzar la BHE, el efecto sobre tejidos más afectados por la enfermedad y si altera otras rutas metabólicas. A pesar de haberse parado el desarrollo clínico por problemas en los ensayos preclínicos con primates, recientemente se ha iniciado un ensayo clínico de fase II.<sup>2</sup> El CPP seleccionado en nomlabofusp es TAT, un péptido rico en argininas derivado la proteína transactivadora de la transcripción génica del virus de inmunodeficiencia humana.<sup>3,4</sup> Este péptido se ha usado para internalizar multitud de compuestos diferentes, tales como nanopartículas, moléculas pequeñas e incluso proteínas.<sup>5,6</sup> Aunque se ha descrito que TAT es capaz de atravesar la BHE,<sup>7</sup> su uso tiene algunos inconvenientes. Por un lado, los cargos modificados con TAT internalizan principalmente *via* endocitosis, acabando en estructuras lisosomales que conducen a su degradación. Por otra parte, una vez en el citoplasma, TAT tiene preferencia por el núcleo, lo que puede dificultar la distribución de los cargos a otros orgánulos tales como la mitocondria.

Nuestra hipótesis de partida es que **la modificación de FXN con un péptido lanzadera de la barrera hematoencefálica (pL-BHE) optimizado mejorará la eficacia de un tratamiento de terapia de reemplazamiento para la ataxia de Friedreich**; ello permitirá una mejor distribución de la FXN en los tejidos afectados y, por tanto, una reducción en la dosis de proteína suministrada, minimizando los posibles efectos colaterales. Para desarrollar esta hipótesis proponemos el uso del péptidomimético "A", desarrollado en el IRB Barcelona. Este compuesto, ha demostrado aumentar el transporte de proteínas y un anticuerpo monoclonal, tanto *in vitro* como en varios modelos de ratón, **existiendo varios grupos de patentes que protegen su uso**. Recientemente, una formulación orientada para el tratamiento de un tumor pediátrico basada en este compuesto, **acaba de conseguir la designación de medicamento huérfano por parte de la Agencia Europea del Medicamento.**<sup>(a-d)</sup>

En este proyecto **proponemos la unión de la frataxina humana (FXN<sub>1-210</sub>) al péptido A** mediante un enlace disulfuro, que permita la liberación de la proteína en el citoplasma celular para poder así acceder a la mitocondria para llevar a cabo su función. Asimismo, nos proponemos analizar su biodistribución en diferentes tejidos de ratón modelo de la enfermedad (FXN<sup>I151F</sup>)<sup>8</sup>. El desarrollo de estos objetivos generales, se concreta en las siguientes tareas específicas:

1. **Expresión de la proteína FXN<sub>1-210</sub> de forma recombinante.** El laboratorio de la Dra. Sánchez Navarro ya tiene experiencia en la obtención y purificación de esta proteína.
2. **Modificación de la proteína FXN<sub>1-210</sub> con el péptido A.** El laboratorio de la Dra.

Sánchez Navarro ha participado en el desarrollo de dicho péptido y tiene experiencia en su uso.

3. **Caracterización de la actividad *in vitro* de las proteínas preparadas en modelos relevantes de la enfermedad.** El laboratorio del Prof. Joaquim Ros tiene extensa experiencia en el uso de cultivos derivados de pacientes y dispone de modelo animal de la enfermedad caracterizado<sup>8</sup>. Se llevarán a cabo experimentos para evaluar el efecto de la proteína A-FXN en procesos relacionados con el metabolismo de FXN. Por ejemplo, se evaluará el efecto sobre el factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2 (Nrf2) y los complejos mitocondriales I (CI) y II (CII) del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS). La cuantificación de estos marcadores ofrece información sobre la cantidad de FXN entregada y si se está procesando en el interior celular. Nrf2 es un regulador transcripcional de vías implicadas en la regulación de especies reactivas de oxígeno y juega un papel importante en el desarrollo de la enfermedad debido a su posible interacción con FXN y su activación ineficiente en el caso de deficiencia de FXN. Los complejos CI y CII de OXPHOS desempeñan un papel esencial en la respiración mitocondrial que se ve afectada en la deficiencia de FXN. Por otra parte, ensayos de actividad metabólica y función mitocondrial mediante la tecnología SeaHorse<sup>®</sup> que permite realizar, de manera no invasiva, la caracterización del metabolismo energético de células en cultivo. Permite determinar parámetros como el consumo de oxígeno (OCR), la respiración relacionada con ATP, la respiración máxima, y la capacidad respiratoria de reserva. Este grupo dispone además de modelos celulares, de cardiomiocitos y neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (DRG), muy afectadas en pacientes de la enfermedad.

4. **Caracterización del transporte a través de la BHE usando modelos *in vitro*.** Estos experimentos se llevarán a cabo en el laboratorio de la Dra. Sánchez Navarro que tiene puesto a punto un modelo de transporte de la BHE.

5. **Análisis del incremento de frataxina en tejidos de ratón modelo de la enfermedad.** Se analizarán ganglios de la raíz dorsal, corazón cerebro y cerebelo. El grupo del Dr. J. Ros tiene experiencia en aislar y cuantificar frataxina en tejidos aislados de ratón.<sup>8</sup>

### CRONOGRAMA

		Año 1			
		T1	T2	T3	T4
<b>Obj. 1</b>	<b>Obtención de FXN</b>				
	Expresión de FXN de forma recombinante				
	Síntesis de A				
<b>Obj. 2</b>	<b>Obtención de A-FXN</b>				
	Conjugación de A y FXN				
<b>Obj. 3</b>	<b>Caracterización de la actividad de A-FXN <i>in vitro</i></b>				
	Ensayos <i>in vitro</i>				
<b>Obj. 4</b>	<b>Evaluación del transporte en modelos <i>in vitro</i> de BHE</b>				
	Ensayos <i>in vitro</i> de transporte a través de la BHE				

<b>Obj. 5</b>	<b>Análisis del incremento de frataxina en tejidos de ratón modelo de FA</b>				
	Obtención de tejidos y análisis de los niveles de frataxina mediante western-blot				

- (a) Inventors: E. Giralt, M. Teixidó, B. Oller-Salvia; Actively transported and protease-resistant peptides as BB shuttles and shuttle-cargo constructs. Priority date: 14/07/2014; N° WO2015001015A1; Licensed to the company Gate2Brain;
- (b) Inventors: M. Sánchez, M. Teixidó, E. Giralt. BBB-shuttle site-specific modification of antibody-based entities able to cross the Blood-Brain Barrier. Priority date: 01/08/2022; WO/2024/028282;
- (c) Inventors: M. Sánchez, M. Teixidó, N. Gené, E. Giralt, A. Montero. Peptidic conjugates of SN38 useful in the treatment of cancer. Priority date: 28/09/2020; WO2022064052A1. Licensed to the company Gate2Brain.
- (d) <https://www.irsjd.org/es/actualidad/noticias/1006/gate2brain-obtiene-la-designacion-de-medicamento-huerfano-de-la-ema-para-su-tratamiento-pionero-en-cancer-pediatrico>

## REFERENCIAS

- (1) A Phase 1 Single Ascending Dose Study to Assess the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of Subcutaneous CTI-1601 Versus Placebo in Subjects With Friedreich's Ataxia. November 14, 2019. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04176991>.
- (2) Jive: An Open Label Extension Study to Assess the Long-Term Safety, Efficacy, Pharmacodynamics, Pharmacokinetics, and Tolerability of Subcutaneous CTI-1601 in Subjects With Friedreich's Ataxia. February 15, 2024. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT06447025>.
- (3) Frankel, A. D.; Pabo, C. O. Cellular Uptake of the Tat Protein from Human Immunodeficiency Virus. *Cell* **1988**, 55 (6), 1189–1193. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90263-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90263-2).
- (4) Green, M.; Loewenstein, P. M. Autonomous Functional Domains of Chemically Synthesized Human Immunodeficiency Virus Tat Trans-Activator Protein. *Cell* **1988**, 55 (6), 1179–1188. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90262-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90262-0).
- (5) Oller-Salvia, B.; Sánchez-Navarro, M.; Giralt, E.; Teixidó, M. Blood-Brain Barrier Shuttle Peptides: An Emerging Paradigm for Brain Delivery. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, 45 (17), 4690–4707. <https://doi.org/10.1039/c6cs00076b>.
- (6) Guidotti, G.; Brambilla, L.; Rossi, D. Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics. *Trends Pharmacol. Sci.* **2017**, 38 (4), 406–424. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.01.003>.
- (7) Schwarze, S. R.; Ho, A.; Vocero-Akbani, A.; Dowdy, S. F. In Vivo Protein Transduction: Delivery of a Biologically Active Protein into the Mouse. *Science (80-. ).* **1999**, 285 (5433), 1569 LP – 1572. <https://doi.org/10.1126/science.285.5433.1569>.
- (8) Medina-Carbonero M, Sanz-Alcázar A, Britti E, Delaspre F, Cabisco E, Ros J, Tamarit J. Mice harboring the FXN I151F pathological point mutation present decreased frataxin levels, a Friedreich ataxia-like phenotype, and mitochondrial

