

Desenvolupament d'una nova variant de Frataxina (FXN) com a candidata a teràpia de reemplaçament proteic per a la Atàxia de Friedreich.

Aquest projecte té com a **objectiu principal el desenvolupament d'una nova proteïna candidata a fàrmac de teràpia de reemplaçament per a la malaltia atàxia de Friedreich (AF)** amb una distribució al sistema nerviós central (SNC) millorada.

Recentment, un anàleg de FXN, **nomlabofusp** (CTI-1601), format per un pèptid que penetra a les cèl·lules (CPP, de l'anglès cell-penetrating peptide), i la seqüència de FXN, ha estat avaluat en assaigs clínics de fase I (NCT0417699 (NCT06447025)).^{1,2} Els resultats del primer assaig clínic van mostrar quantitats superiors de FXN en pell, cèl·lules bucals i sang.¹ Tot i això, encara no hi ha dades sobre la seva capacitat per creuar la BHE, l'efecte sobre teixits més afectats per la malaltia i si altera altres rutes metabòliques. Tot i haver-se aturat el desenvolupament clínic per problemes en els assaigs preclíncs amb primats, recentment s'ha iniciat un assaig clínic de fase II.² El CPP seleccionat en nomlabofusp és TAT, un pèptid ric en arginines derivat de la proteïna transactivadora de la transcripció gènica del virus de d'immunodeficiència humana.^{3,4} Aquest pèptid s'ha fet servir per internalitzar multitud de compostos diferents, com ara nanopartícules, molècules petites i fins i tot proteïnes.^{5,6} Encara que s'ha descrit que TAT és capaç de travessar la BHE,⁷ el seu ús té alguns inconvenients. D'una banda, modificades amb TAT internalitzen principalment via endocitosi, i acaben en estructures lisosomals que condueixen a la seva degradació. D'altra banda, un cop al citoplasma, TAT té preferència pel nucli, cosa que pot dificultar la distribució a altres òrgans com el mitocondri.

La nostra hipòtesi de partida és que la modificació de FXN amb un pèptid llançador de la barrera hematoencefàlica (pL-BHE) optimitzat millorarà l'eficàcia d'un tractament de teràpia de reemplaçament per a l'atàxia de Friedreich; això permetrà una millor distribució de la FXN als teixits afectats i, per tant, una reducció en la dosi de proteïna subministrada, minimitzant els possibles efectes col·laterals. Per desenvolupar aquesta hipòtesi es proposa l'ús del péptidomimètic "A", desenvolupat a l'IRB Barcelona. Aquest compost ha demostrat augmentar el transport de proteïnes i d'un anticòs monoclonal, tant in vitro com en diversos models de ratolí, i **hi ha diversos grups de patents que en protegeixen l'ús.**¹ Recentment, una formulació orientada per al tractament d'un tumor pediàtric basada en **aquest compost acaba d'aconseguir la designació de medicament orfe² per part de la AEM (Agència Europea del Medicament).**^(a-d)

En aquest projecte **proposem la unió de la frataxina humana (FXN1-210) al pèptid A** mitjançant un enllaç disulfur, que permeti l'alliberament de la proteïna al citoplasma cel·lular per poder així accedir al mitocondri per dur a terme la seva funció. Així mateix, ens proposem analitzar la seva biodistribució en diferents teixits de ratolí model de la malaltia (FXN151F)⁸. El desenvolupament d'aquests objectius generals, es concreta en les següents tasques específiques:

- 1. Expressió de la proteïna FXN1-210 de manera recombinant.** El laboratori de la Dra. Sánchez Navarro ja té experiència en l'obtenció i la purificació d'aquesta proteïna.
- 2. Modificació de la proteïna FXN1-210 amb el pèptid A.** El laboratori de la Dra. Sánchez Navarro ha participat en el desenvolupament del pèptid i té experiència en el seu ús.
- 3. Caracterització de l'activitat in vitro de les proteïnes preparades en models rellevants de la malaltia.** El laboratori del Prof. Joaquim Ros té extensa experiència en l'ús

de cultius derivats de pacients i disposa de model animal de la malaltia caracteritzat⁸. Es faran experiments per avaluar l'efecte de la proteïna A-FXN en processos relacionats amb el metabolisme de FXN. Per exemple, s'avaluarà l'efecte sobre la proteïna Nrf2 (reguladora de l'expressió de gens antioxidants) i els complexos mitocondrials I (CI) i II (CII) del sistema de fosforilació oxidativa (OXPHOS). La quantificació d'aquests marcadors ofereix informació sobre el nivell de FXN lliurada i si s'està processant a l'interior cel·lular. Nrf2 és un regulador transcripcional de vies implicades en la regulació d'espècies reactives d'oxigen i juga un paper important en el desenvolupament de la malaltia a causa de la possible interacció amb FXN i la seva activació inefficient en el cas de deficiència de FXN. Els complexos CI i CII d'OXPHOS tenen un paper essencial en la respiració mitocondrial que es veu afectada en la deficiència de FXN. D'altra banda, assaigs d'activitat metabòlica i funció mitocondrial mitjançant la tecnologia SeaHorse® que permet fer, de manera no invasiva, la caracterització del metabolisme energètic de cèl·lules en cultiu. Permet determinar paràmetres com el consum d'oxigen (OCR), la respiració relacionada amb ATP, la respiració màxima i la capacitat respiratòria de reserva. Aquest grup disposa a més de models cel·lulars, de cardiomiòcits i neurones dels ganglis de l'arrel dorsal (DRG), molt afectades en pacients de la malaltia.

4. Caracterització del transport a través de la BHE usant models in vitro. Aquests experiments es duren a terme al laboratori de la Dra. Sánchez Navarro que té posat a punt un model de transport de la BHE.

5. Anàlisi de l'increment de frataxina en teixits de ratolí model de la malaltia. S'analitzaran ganglis de l'arrel dorsal, el cor cervell i el cerebel. El grup del Dr. J. Ros té experiència en aïllar i quantificar frataxina en teixits aïllats de ratolí.⁸

CRONOGRAMA

		Any 1			
		T1	T2	T3	T4
Obj. 1	Obtenció de FXN				
	Expressió de FXN de forma recombinant				
	Síntesi del compost A				
Obj. 2	Obtenció de A-FXN				
	Conjugació de A-FXN				
Obj. 3	Caracterització de la activitat de A-FXN in vitro				
	Assaigs in vitro				
Obj. 4	Avaluació del transport en models in vitro de BHE				
	Assaigs in vitro de transport a través de la BHE				
Obj. 5	Anàlisi de l'increment de frataxina en teixits de ratolí model de FA				
	Obtenció de teixits i anàlisi dels nivells de frataxina per 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; Nº 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>

REFERÈNCIES

- (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 alterations. *Cell Mol Life Sci.* **2022**; 79(2):74. doi: 10.1007/s00018-021-04100-5