



Fundació
La Marató de TV3

22è SIMPOSIUM
Diabetis i Obesitat



APUNTANT CAP A LES CAUSES GENÈTIQUES DE LA DIABETIS A TRAVÉS DE LA TERÀPIA GÈNICA: APROXIMACIONS TERAPÈUTIQUES PER MODY

Fàtima Bosch Tubert

Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica - Universitat Autònoma de Barcelona

Steve Brown

Medical Research Council – Oxfordshire

Martin Hrabe de Angelis

Helmholtz Center Munich, German Research – Neuherberg

1. Resum

La diabetis tipus MODY (acrònim de *maturity onset diabetes of the young*) comprèn un grup heterogeni de trastorns monogènics caracteritzats per l'aparició d'hiperglucèmia a una edat adulta primerenca, generalment abans dels 25 anys. Les MODY són una causa rara de diabetis, tot i que col·lectivament poden representar un 1-2 % de tots els casos. Els pacients amb MODY generalment es diagnostiquen de manera errònia com a pacients diabètics de tipus 1 o tipus 2 i es tracten amb canvis en l'estil de vida o medicaments que no aborden el defecte genètic subjacent de la malaltia. La cura genètica de les MODY no s'havia intentat abans, per tant, l'objectiu principal d'aquesta proposta era desenvolupar aproximacions de teràpia gènica per a les formes més prevalents de MODY (MODY1 i MODY3) basades en l'ús de vectors virals adenoassociats (AAV). La transferència gènica dels gens terapèutics a les cèl·lules beta seria *per se* curativa i seria raonable esperar-ne un benefici significatiu respecte a les estratègies terapèutiques existents. Amb aquesta finalitat, s'han dissenyat i produït vectors AAV que codifiquen els gens d'interès sota el control de les seqüències reguladores més adequades. L'eficàcia terapèutica després de l'administració intraductal es va demostrar en models animals de la malaltia mitjançant una bateria de proves bioquímiques, funcionals i histopatològiques. Per tant, l'assoliment amb èxit dels objectius d'aquesta proposta no només obriria el camí al tractament dels pacients amb MODY, sinó també al desenvolupament d'aproximacions de teràpia gènica per a altres formes monogèniques de diabetis o per a la diabetis de tipus 2 associada a la hipofuncionalitat de les cèl·lules beta.

Els objectius específics d'aquest projecte són:

1. Generar una col·lecció de cassets d'expressió específics de la malaltia que portin la seqüència de codificació curativa predictiva per a cada MODY.
2. Produir els respectius lots de vectors AAV que portin aquests cassets terapèutics.
3. Per a aquelles formes de MODY per a les quals no hi ha un model disponible, generar o fenotipar el model de ratolí.
4. Proporcionar proves de concepte de l'eficàcia terapèutica dels vectors AAV generats en els models de ratolí corresponents.
5. Generar propietat intel·lectual (IP) per a aquelles aproximacions per a les quals es demostrï clarament l'eficàcia terapèutica.

Els principals èxits d'aquest projecte de col·laboració han estat la generació i caracterització de nous models de ratolí MODY1 i MODY3 i la generació de dades que demostren l'eficàcia de les proves de concepte d'una transferència gènica *in vivo* amb vectors AAV per a un gen específic de MODY.

2. Resultats

Durant aquest projecte, hem pogut obtenir i caracteritzar dos nous models de ratolí MODY1 i MODY3. Existeixen models de ratolí de MODY1 i MODY3, però no reproduïen correctament el fenotip de la malaltia humana, tot i que la sobreexpressió específica de les cèl·lules beta de mutants negatius dominants d'HNF1A en dues línies diferents de ratolins transgènics recapitula estretament la disfunció de les cèl·lules beta i la diabetis observades a MODY3, sense fenotip extrapancreàtic. Tanmateix, aquestes línies no es poden utilitzar per avaluar el potencial terapèutic de la teràpia gènica mitjançant AAV per a MODY3 proposada en aquest projecte, ja que, a les cèl·lules beta d'aquests models, els mutants negatius dominants segrestarien la forma salvatge de la proteïna HNF1A derivada de l'AAV. Així, per eludir aquesta limitació, s'ha generat un model de ratolí genoanul·lat (*knock-out*) HNF1A específic per a cèl·lules beta de MODY3 mitjançant una estratègia única i innovadora basada en la tecnologia CRISPR/Cas9. Per a això, hem dissenyat una guia d'ARN que reconeix una seqüència específica del gen *HNF1A* del ratolí i un donant d'ADN que conté dues còpies de la seqüència diana d'un miARN específic del pàncrees. Els miARN són petits ARN no codificants que s'uneixen específicament a certs mARN i n'impedeixen la traducció. La incorporació de seqüències diana d'un miARN específic del pàncrees al locus del gen *HNF1A* va impedir la producció d'HNF1A específicament en aquest teixit, fet que va generar un nou model de ratolí MODY3. En primer lloc, es va microinjectar la guia d'ARN, la Cas9 i el donant d'ADN, que conté dues còpies de miARN, al pronucli d'embrions de ratolí C57Bl/6 d'una cèl·lula. Un cop vam obtenir els ratolins a partir de la microinjecció, es van genotipar per PCR i per seqüenciació mitjançant Sanger del producte obtingut de la PCR. Basant-se en els resultats del genotipatge, es van seleccionar ratolins MODY3 genomodificats (*knock-in*, KI) com a fundadors i es van creuar amb ratolins control (C57BL6) per segregar possibles mutacions *off-target*.

De la mateixa manera, s'ha generat un model de ratolí HNF4A específic per a cèl·lules beta de MODY1 que impedeix la traducció d'HNF4A. Per reduir fortament la producció de la proteïna HNF4A a les cèl·lules beta, vam generar una línia de ratolí MODY1 mitjançant una estratègia similar a la de MODY3, mitjançant la tecnologia CRISPR/Cas9. Un total de 54 ratolins van néixer després de la injecció al pronucli de l'ADN diana. Tots els ratolins van ser genotipats per PCR i posterior digestió enzimàtica, així com per seqüenciació de Sanger del producte PCR. Basant-se en aquests resultats, es van seleccionar tres animals fundadors i es van creuar amb ratolins *wild-type* (WT) C56BL/6N per obtenir la generació F1. Una vegada més, tots els ratolins van ser genotipats per PCR i posterior digestió enzimàtica, així com per seqüenciació de Sanger del producte PCR. Es van criar cinc parelles reproductores heterozigotes F2 per establir la cohort F3 final.

La caracterització completa d'aquests models animals va demostrar que recapitulen estretament les malalties MODY1 i MODY3. Concretament, hem demostrat que tant els ratolins homozigots, tant mascles com femelles, de les dues línies KI MODY3 van mostrar una disminució important de l'expressió d'HNF1A i els nivells de proteïnes específicament en els illots pancreàtics. El seguiment de la glicèmia va revelar que, de manera similar als pacients, els ratolins homozigots MODY3 de tots dos sexes eren lleugerament hiperglucèmics en condicions d'alimentació i dejú. A més, els ratolins MODY3 van mostrar una tolerància alterada a la glucosa en comparació amb els ratolins WT en edats joves i adultes. En general, el fenotip diabètic es va agreujar més en ratolins MODY3 mascles que femelles. No es van detectar diferències significatives en la morfologia dels illots entre ratolins MODY3 i ratolins WT. No obstant això, els ratolins MODY3 van mostrar una reducció tant en l'àrea mitjana d'illots com en la massa de cèl·lules β en comparació amb els ratolins WT. D'acord amb això, els ratolins homozigots MODY3 mascles i femelles presentaven una insulinèmia reduïda. A més, els ratolins MODY3 van presentar defectes en la secreció d'insulina *in vivo* i *in vitro*. Aquests resultats van indicar que el fenotip del pàncrees dels ratolins homozigots MODY3 s'assemblava al dels pacients MODY3, amb defectes de cèl·lules β i insulopènia. En les cèl·lules β pancreàtiques, HNF1A s'ha descrit com a regulador de la expressió d'insulina i de gens de factors de transcripció claus en la cèl·lula β , així com de l'expressió de proteïnes implicades en el transport de glucosa, en el metabolisme i en la funció mitocondrial, tots ells involucrats en la secreció d'insulina. Tant els ratolins MODY3 mascles com femelles van mostrar una expressió marcadament reduïda de tots

els gens diana HNF1A examinats. Així, hem desenvolupat un nou model de ratolí MODY3 específic de cèl·lules β que imita el fenotip clínic dels pacients amb MODY3.

El segon assoliment principal d'aquest projecte és un estudi preclínic de l'eficàcia d'un producte de teràpia gènica per a MODY3. Els nostres resultats mostren clarament que el producte de teràpia gènica desenvolupat pot contrarestar la diabetis en un model de ratolí MODY3.

El desenvolupament dels productes de teràpia gènica requereix primer generar i caracteritzar vectors AAV. Aquest procés consta dels següents passos:

a) Generació de cassets d'expressió de vectors AAV que contenen el gen HNF1A sota el control d'un promotor específic de cèl·lules beta

Per generar vectors AAV8 que codifiquen HNF1A sota el control del promotor específic de cèl·lules beta més adequat, es van seleccionar tres promotors candidats específics de cèl·lules β (β P1, β P2 i β P3). Es van generar cassets d'expressió que codifiquen la proteïna fluorescent verda (GFP) sota el control del promotor candidat β P1, β P2 o β P3 i flanquejats per les repeticions terminals invertides (ITR) d'AAV2.

Els vectors AAV8 que codifiquen GFP sota el control de cada promotor candidat (AAV8- β P1-GFP, AAV8- β P2-GFP o AAV8- β P3-GFP) es van produir per triple transfecció a les cèl·lules HEK293. Per avaluar l'especificitat de cèl·lula beta, es van administrar ratolins WT intraductalment amb vectors AAV8- β P1-GFP, AAV8- β P2-GFP o AAV8- β P3-GFP. La quantificació de l'expressió de GFP va confirmar que β P1 va promoure la màxima expressió i producció de GFP en illots pancreàtics. La doble immunodetecció contra la GFP i insulina en les seccions de pàncrees va confirmar que l'expressió del transgèn mitjançant els promotors candidats de β P1 i β P2 en illots era específica de la cèl·lula beta, mentre que β P3 presentava expressió també en cèl·lules acinars. Per tant, es va descartar β P3 per a futurs experiments, ja que l'expressió del transgèn promoguda per aquest promotor candidat no era específica de les cèl·lules beta.

b) Producció, purificació i caracterització de lots de vectors AAV8: vectors AAV8 que codifiquen els gens HNF1A o GFP o nuls

Un cop seleccionats els promotors, es van generar cassets d'expressió de vectors AAV que codificaven pel cDNA HNF1A sota el control del promotor β P1 o β P2 i es van clonar

en plasmidis troncats AAV monocatenaris. Els vectors AAV8 es van produir per triple transfecció en cèl·lules HEK293 (AAV8- β P1-HNF1 α , AAV8- β P2-HNF1 α).

c) Avaluació in vivo de l'activitat biològica dels diferents lots de vectors AAV després de l'administració intraductal a ratolins sans

Per avaluar si β P1 i β P2 van ser capaços de promoure l'expressió d'HNF1 α en cèl·lules beta i determinar si aquesta sobreexpressió era segura, es va administrar intraductalment vectors AAV8- β P1-HNF1 α , AAV8- β P2-HNF1 α o PBS a ratolins sans. La quantificació de l'expressió d'HNF1 α mitjançant qPCR va confirmar la sobreexpressió del transgèn en els illots d'animals administrats amb vectors AAV8- β P1-HNF1 α i AAV8- β P2-HNF1 α en comparació amb ratolins del grup control.

Els ratolins tractats intraductalment amb vectors AAV8- β P1-HNF1A van mostrar una disminució del nombre d'illots i de la massa de cèl·lules β , mentre que els ratolins tractats amb AAV8- β P2-HNF1A presentaven una morfologia normal del pàncrees. A més, no es van observar diferències en el pes corporal, la glucèmia ni la tolerància a la glucosa entre el grup de control i els ratolins als quals es van administrar els vectors AAV8- β P2-HNF1 α , cosa que en destaca encara més la seguretat. Per tant, es van triar els vectors AAV8- β P2-HNF1A per a l'avaluació posterior de l'eficàcia terapèutica de MODY3.

Un cop obtinguts i caracteritzats els vectors AAV candidats, se n'ha avaluat l'eficàcia terapèutica en el model de ratolí MODY3.

Per avaluar l'eficàcia terapèutica de l'AAV8- β P2-HNF1A, aquest vector es va administrar intraductalment a ratolins homozigots MODY3. Els ratolins WT injectats amb PBS es van utilitzar com a controls sans i els ratolins homozigots MODY3 que havien rebut PBS van ser utilitzats com a controls de la malaltia. Els ratolins MODY3 tractats amb AAV8-HNF1 α van presentar una sobreexpressió important d'HNF1A que va augmentar l'expressió d'algunes dianes d'aquest gen. A més, els ratolins tractats amb AAV8-HNF1 α van mostrar una millora de la hiperglucèmia lleu en condicions d'alimentació i dejú, així com de la tolerància a la glucosa. L'anàlisi dels nivells d'insulina en circulació va revelar que els ratolins MODY3 tractats amb vectors AAV8-HNF1 α presentaven un augment de la insulinèmia en alimentació.

Actualment, s'està duent a terme un estudi en profunditat per comprendre millor els mecanismes subjacents a l'eficàcia terapèutica dels vectors AAV8-HNF1A.

S'ha utilitzat un enfocament similar per desenvolupar un producte de teràpia gènica per a MODY1 i avaluar-ne l'eficàcia terapèutica després de l'administració intraductal a ratolins MODY1.

3. Rellevància i possibles implicacions futures

El desenvolupament de models animals de malalties que reproduïxen estretament la malaltia humana és crucial per a l'avaluació preclínica d'estratègies terapèutiques. En aquest projecte, hem generat dos nous models de ratolí *knock-in* mitjançant una estratègia única i innovadora basada en la incorporació de seqüències dianes de miARN específiques de teixit en el locus HNF4a o HNF1 utilitzant la tecnologia CRISPR/Cas9. Notablement, aquests dos nous models de ratolí imiten el fenotip clínic humà de pacients amb MODY1 i MODY3, fet que permetrà realitzar proves de l'eficàcia terapèutica de les noves estratègies de teràpia gènica basades en AAV també desenvolupades en el projecte. Aquests models de ratolí també seran molt útils per desenvolupar i provar altres intervencions terapèutiques (inclosos fàrmacs antidiabètics, teràpia de reemplaçament de proteïnes i aproximacions de teràpia gènica) per a MODY en el futur. A més, la nova tecnologia desenvolupada per generar els nous models de ratolí MODY1 i MODY3 es pot aplicar per reduir l'expressió de qualsevol gen endogen i obtenir nous organismes genèticament modificats (animals i plantes), no només per a malalties monogèniques sinó també per a malalties complexes/poligèniques (sol·licitud de patent EP21382080.6). La nova tecnologia s'associa amb menys efectes secundaris en comparació amb els models convencionals globals i condicionals de *knock-out* i *knock-down*.

En aquest projecte, també hem desenvolupat estratègies de teràpia gènica basades en AAV per tractar amb èxit el fenotip diabètic dels models de ratolí MODY generats recentment. La cura genètica de les MODY no s'havia intentat abans. Els nostres resultats constitueixen la primera demostració per contrarestar genèticament una diabetis monogènica i obren el camí al tractament dels pacients amb MODY en el futur (sol·licitud de patent EP21382079.8). A més, els nostres resultats també contribuiran

al desenvolupament futur de noves aproximacions de teràpia gènica per a altres formes monogèniques de diabetis o fins i tot per a diabetis de tipus 2. Hem demostrat que la transferència gènica de la seqüència codificant correcta de la proteïna danyada als teixits afectats és curativa. Per tant, s'espera raonablement un benefici significatiu respecte a les estratègies terapèutiques existents o d'altres en desenvolupament. La teràpia gènica *in vivo*, en particular, ofereix la possibilitat d'un tractament únic, amb la perspectiva d'obtenir efectes beneficiosos durant tota la vida, ja que la producció de la proteïna terapèutica durant llargs períodes de temps després d'una única administració del producte de teràpia gènica ha estat repetidament demostrada en diversos models animals i humans. Actualment, set teràpies basades en gens ja han rebut l'autorització de comercialització dels organismes reguladors d'Europa i els Estats Units. A més, el progrés important en l'àmbit clínic probablement continuarà alimentant la canalització de medicaments terapèutics avançats aprovats (ATMP) en un futur proper. L'objectiu final del nostre projecte és transferir les estratègies terapèutiques per a MODY mitjançant AAV desenvolupades en aquest projecte a una empresa biotecnològica o farmacèutica per accelerar la seva traducció clínic.

4. Bibliografia científica generada

Els resultats obtinguts en aquest projecte han permès presentar dues sol·licituds de patents. La primera sol·licitud de patent reivindica un nou mètode de generació de models de ratolí *knock-down* específics de teixits mitjançant la incorporació de seqüències diana de microARN en el gen desitjat, amb els exemples de ratolins MODY1 i MODY3 (EP21382080.6). La segona reivindicació és el desenvolupament d'una estratègia de teràpia gènica basada en AAV per a MODY3 (EP21382079.8). A continuació, s'especifiquen els detalls addicionals corresponents a aquestes dues sol·licituds de patent:

TÍTOL: ***Down-regulation of endogenous genes***

TITULAR: Universitat Autònoma de Barcelona (Espanya) i Helmholtz Zentrum München (Alemanya)

INVENTORS: Fàtima Bosch, Verónica Jiménez, Miquel Garcia, Estefanía Casaña, Martin Matthias Hrabě de Angelis, Gerhard Kurt Herbert Przemeck, Anna-Lena Amend

NÚM. DE SOL·LICITUD: **EP21382080.6**

PAÍS DE PRIORITAT: Europa
DATA DE PRIORITAT: 30-01-2021

TÍTOL: ***Gene therapy for monogenic diabetes***

TITULAR: Universitat Autònoma de Barcelona

INVENTORS: Fàtima Bosch, Verónica Jiménez, Miquel Garcia, Estefanía Casaña

Núm. DE SOL·LICITUD: **EP21382079.8**

PAÍS DE PRIORITAT: Europa

DATA DE PRIORITAT: 30-01-2021

Actualment, s'estan preparant dos articles científics que inclouen els resultats derivats d'aquest projecte d'investigació i que es presentaran a revistes científiques d'alt impacte en un futur proper.

Estefanía Casana, Verónica Jiménez, Miquel Garcia, Alba Casellas, Tura Ferré, Meritxell Morró, Víctor Sacristán, Claudia Jambrina, Xavier Leon, Roger Cox, Martin Hrabě de Angelis, Steve Brown, Fatima Bosch.

Treatment of MODY3 disease by AAV-mediated gene therapy.

En preparació.