

## PROYECTO DE TERAPIA GÉNICA PARA EL SÍNDROME DE DRAVET

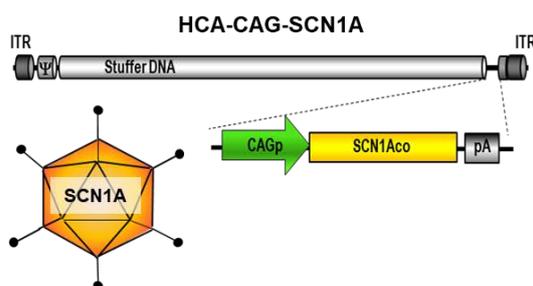
### El síndrome de Dravet y la terapia génica.

El síndrome de Dravet (SD) es una encefalopatía genética caracterizada por crisis epilépticas fármaco-resistentes asociadas a retraso cognitivo, alteraciones motoras, hiperactividad y elevado riesgo de muerte súbita (10% aproximadamente)<sup>1</sup>. Se manifiesta a partir de los 4-6 meses de edad, con una incidencia de 1:15.000 nacimientos, y conlleva una situación de dependencia permanente, con un alto impacto social y económico. En más del 80% de los casos la enfermedad se debe a mutaciones en uno de los dos alelos del gen *SCN1A*, que codifica para la subunidad alfa de un canal de sodio dependiente de voltaje (Nav1.1)<sup>2</sup>. Esta proteína es esencial para el correcto funcionamiento de las interneuronas inhibitorias en el cerebro<sup>3,4</sup>. La fisiopatología más aceptada actualmente es la haploinsuficiencia del gen *SCN1A* (pérdida funcional de uno de los dos alelos), por lo que hay varias iniciativas en el campo de la terapia génica centradas en el incremento de la producción del canal Nav1.1. La esperanza es poder mejorar no solamente el fenotipo epiléptico, sino todas las manifestaciones asociadas al SD. Un grupo de estrategias se centran en incrementar la expresión de Nav1.1 a partir del alelo sano mediante administración intratecal de oligonucleótidos antisentido (ASO)<sup>5,6</sup>. Con el mismo objetivo, otros grupos plantean la expresión de factores de transcripción artificiales a partir de vectores AAV<sup>7</sup>.

Por último, la suplementación génica ofrece la posibilidad de aportar una copia sana del gen *SCN1A*, de modo que se podría conseguir un efecto terapéutico duradero a partir de una única administración, sin la necesidad de expresar proteínas exógenas. En este sentido, la capacidad de clonaje y la estabilidad genética de los vectores adenovirales de alta capacidad (HC-AdV)<sup>8</sup> los convierten en posibles candidatos para esta aplicación.

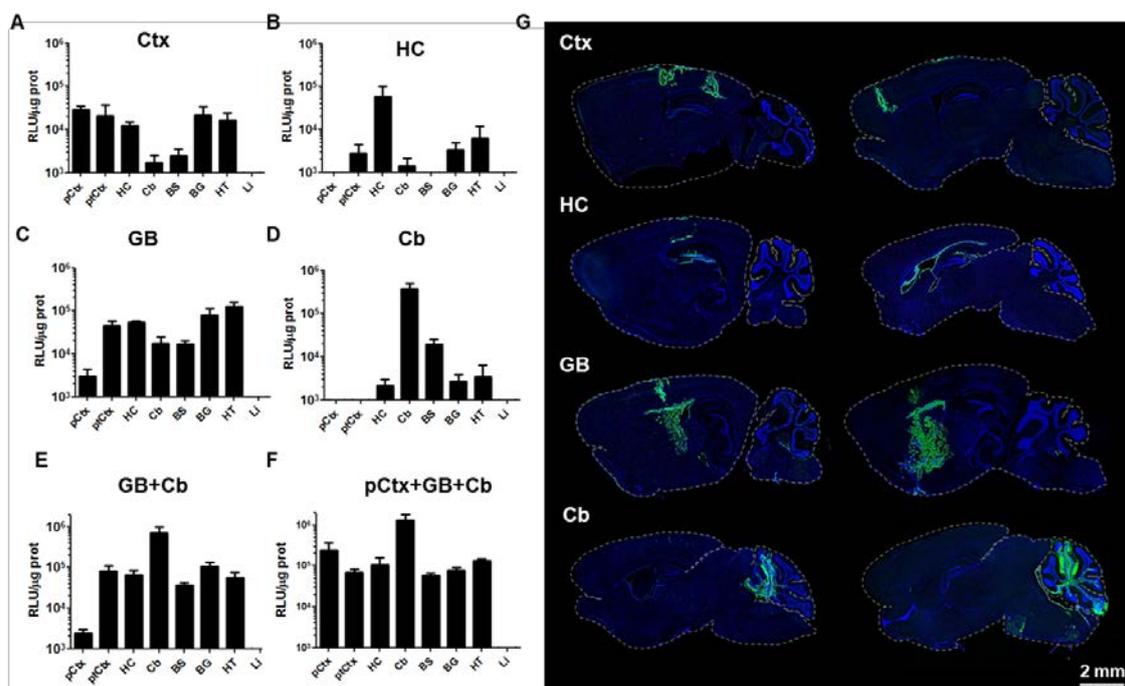
### Resultados previos del proyecto.

Nuestro grupo ha llevado a cabo una prueba de concepto produciendo un HC-AdV que expresa *SCN1A* bajo el control de un promotor ubicuo (figura 1). Los resultados muestran que la estrategia es factible y tiene potencial terapéutico<sup>9</sup>.



**Figura 1. Representación esquemática del vector HCA-CAG-SCN1A.** El casete de expresión consta de un fuerte promotor ubicuo (CAG), la versión optimizada de la secuencia codificante de *SCN1A* humana, y una señal de poli-adenilación (pA). ITR, inverted terminal repeats de Adenovirus; Ψ, señal de empaquetamiento; Stuffer DNA, secuencia de ADN de relleno para alcanzar el tamaño mínimo de encapsidación de Adenovirus.

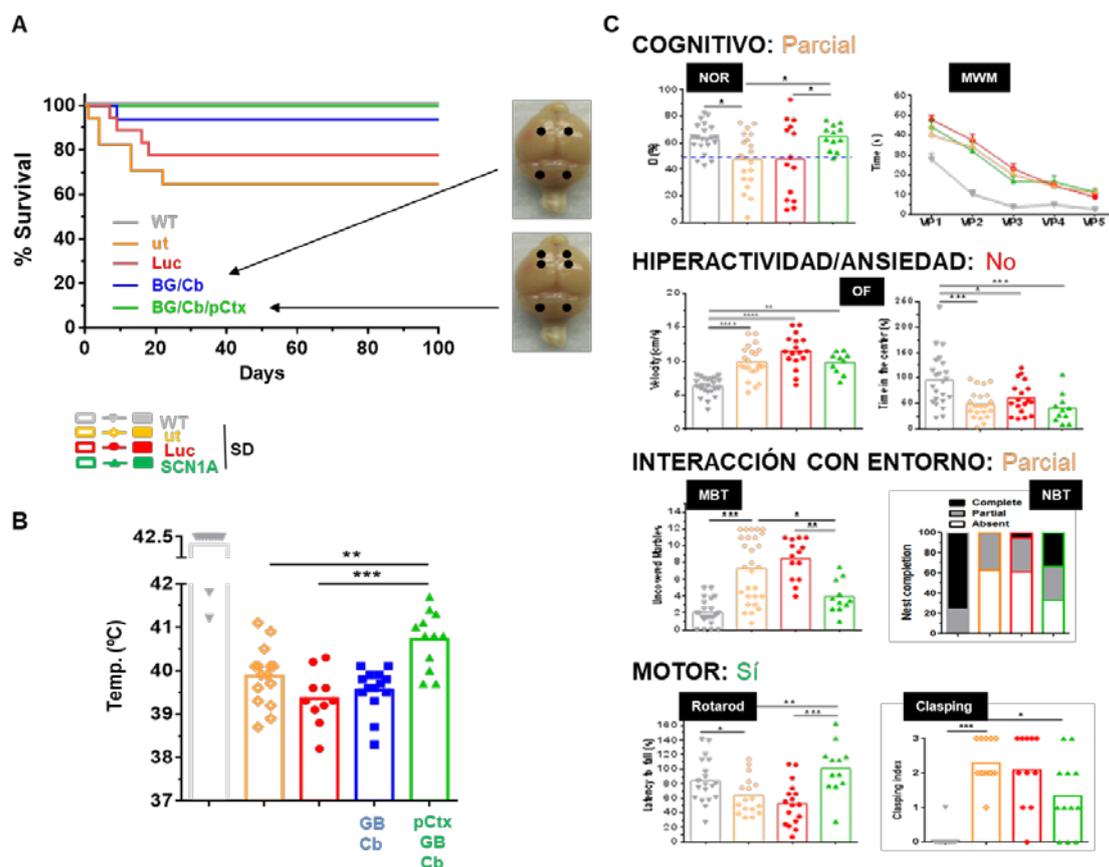
Para lograr una cobertura relativamente amplia del cerebro fue necesaria la administración del vector en varios puntos, como se puso de manifiesto utilizando vectores portadores de genes reporteros como Ad-CAG-GL (figura 2).



Para la evaluación de la terapia génica se cuenta con un modelo de ratón (ratones SD) que recapitula fielmente el SD tanto a nivel genético como de manifestaciones clínicas. Este modelo fue diseñado por la Fundación Síndrome de Dravet y se caracterizó exhaustivamente como fase inicial del proyecto<sup>10</sup>. La administración estereotáctica del vector HCA-CAG-SCN1A en los ganglios basales y el cerebelo consiguió mejorar la supervivencia de los ratones SD. Sin embargo, fue necesario incluir un tercer punto de inyección bilateral (corteza prefrontal) para comenzar a observar efecto terapéutico en otros parámetros. Esta ruta de administración consiguió mejorar la función motora y

Confidencial

varios aspectos de comportamiento (figura 3). Sin embargo, el efecto sobre la protección frente a crisis epilépticas inducidas por hipertermia y la capacidad cognitiva fue parcial, y todavía no se ha obtenido mejora sobre otras manifestaciones como la hiperactividad o la ansiedad en el modelo animal.

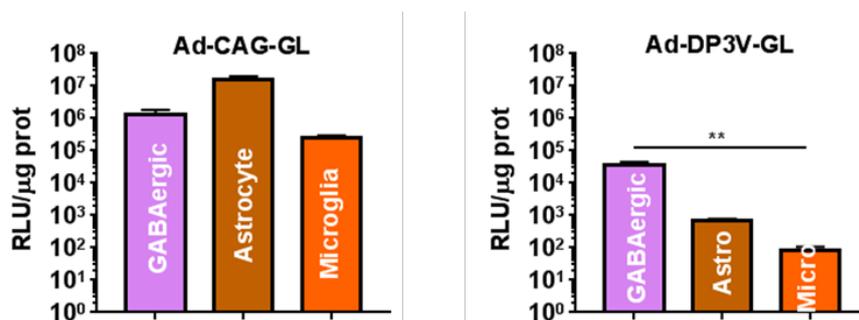


**Figura 3. Efecto terapéutico del vector HCA-CAG-SCN1A en ratones con SD.** El vector se administró en el cerebro de los ratones mediante cirugía estereotáctica de forma bilateral, siguiendo dos protocolos: inyección en ganglios basales y cerebelo (azul), y combinación con corteza prefrontal (verde). **A.** Supervivencia de los ratones en cada grupo a partir del tratamiento, que se realizó a las 5 semanas de edad. WT, ratones sanos ("wild type"), en gris; ut, ratones SD sin tratar (naranja); Luc, grupo de ratones tratados con un vector control que expresa el gen reportero luciferasa. **B.** Umbral de temperatura a partir del cual los ratones sufren convulsiones. Cada símbolo indica un ratón individual, y la barra señala la media de los grupos correspondientes. **C.** Evaluación funcional de aspectos cognitivos, motores y de comportamiento utilizando pruebas estandarizadas. NOR, Novel Object Recognition test; MWM, Morris Water Maze test; MBT, Marble Burying test; NBT, Nest Building test. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , test de Kruskal-Wallis.

## Nuevos avances y objetivos futuros.

Sobre la base del efecto terapéutico obtenido con el prototipo de vector HCA-CAG-SCN1A, planteamos optimizaciones a distintos niveles. Estas mejoras incluyen las rutas de administración y el control de la expresión del transgén. El objetivo es lograr una mejoría significativa en todas las manifestaciones de la enfermedad.

Hasta el momento se ha desarrollado un nuevo promotor (DP3V) que favorece la expresión en neuronas inhibitorias (GABAérgicas). Este tipo celular se ha sugerido como la diana más importante en el SD<sup>11</sup>. Ensayos en cultivos primarios de ratón han confirmado que el vector que expresa un gen reportero (GFPLuc) bajo el control de este promotor es relativamente más activo en neuronas GABAérgicas que en otros tipos celulares como los astrocitos o la microglía (figura 4), en contraposición con el vector que contienen el promotor ubicuo CAG.

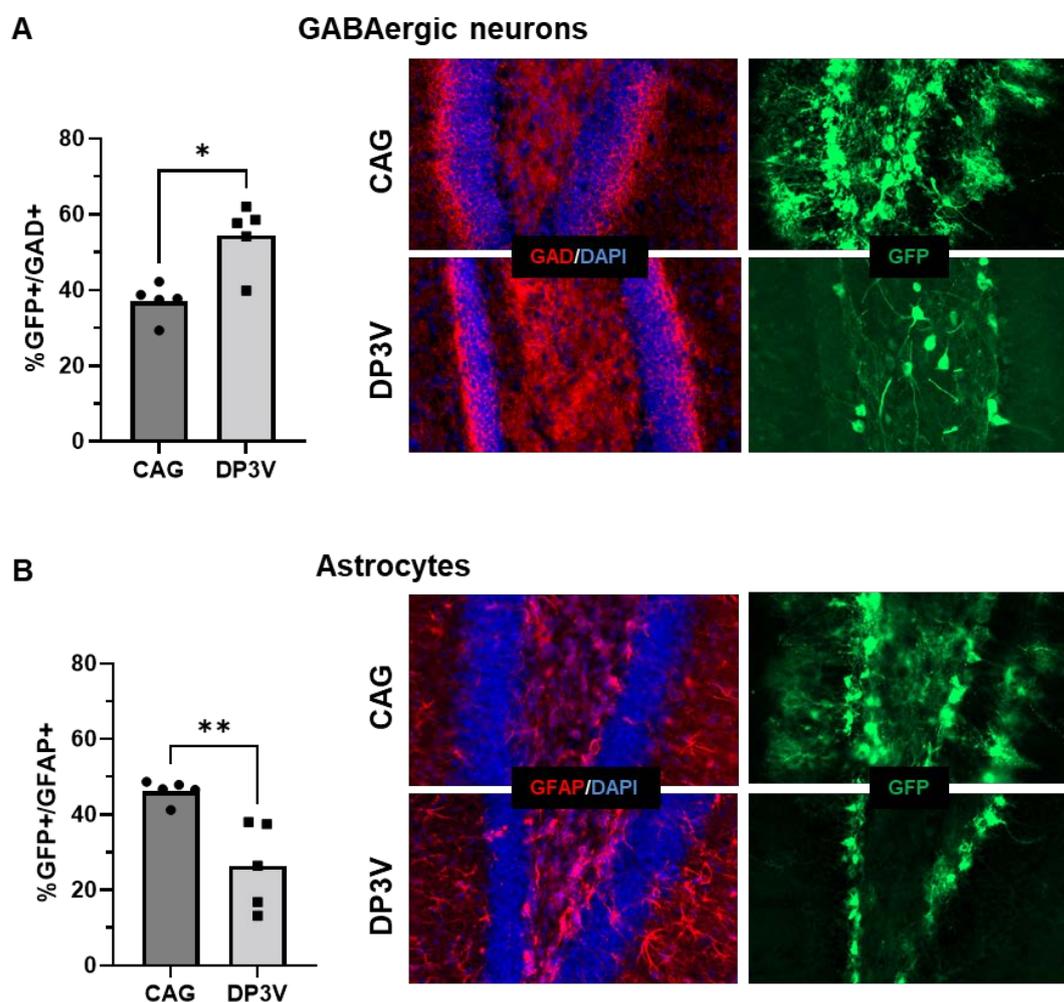


**Figura 4. Evaluación del promotor DP3V en cultivos celulares.** Los vectores Ad-CAG-GL y Ad-DP3V-GL contienen el gen reportero GFP-Luciferasa (GFPLuc) bajo el control de los promotores CAG y DP3V, respectivamente. Se obtuvieron neuronas GABAérgicas, astrocitos y microglía a partir de cerebros de ratón, y se infectaron con los vectores indicados. Al cabo de 48 horas se obtuvieron extractos celulares para determinar la actividad luciferasa. \*\* $p < 0.01$ , test de Kruskal-Wallis.

Este mismo concepto se ha demostrado cuando los vectores se administraron en el cerebro de los ratones, en concreto en la región del hipocampo (figura 5). Es importante señalar que esta selectividad viene acompañada por una menor potencia, como suele ocurrir en el caso de los promotores específicos.

Se ha producido un nuevo vector en el que la secuencia codificante de *SCN1A* se encuentra bajo el control del promotor DP3V. Actualmente se está evaluando su efecto terapéutico en el modelo de ratón de SD. Estos resultados permitirán conocer si la expresión preferencial del gen en neuronas inhibitorias mejora el efecto terapéutico, a pesar de obtener niveles de proteína menores.

Otro aspecto que se está investigando es la inflamación causada por los vectores adenovirales. El objetivo es averiguar si el cerebro afectado por SD sufre un estado pro-inflamatorio que pudiera exacerbar esta respuesta, y en su caso aplicar medidas preventivas.



**Figura 5. Evaluación del promotor DP3V en cerebro de ratón.** Los vectores Ad-CAG-GL y Ad-DP3V-GL se administraron en el hipocampo de ratones mediante cirugía estereotáctica. Al cabo de 48 horas el cerebro de los ratones se procesó para la detección de proteínas específicas mediante inmunofluorescencia. La proteína GFP codificada por los vectores se señala en color verde, mientras que los marcadores de neurona GABAérgica (GAD) y de astrocito (GFAP) se señalan en rojo. Para identificar los núcleos celulares se utilizó la tinción DAPI (azul). Las gráficas de la izquierda corresponden a la cuantificación del porcentaje de células infectadas (GFP<sup>+</sup>) que expresan a la vez el marcador de neurona inhibitoria (A), o de astrocito (B). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , test de Kruskal-Wallis.

Actualizado marzo 2022

## Bibliografía

1. Dravet, C. Dravet syndrome history. *Dev. Med. Child Neurol.* **53 Suppl 2**, 1–6 (2011).
2. Claes, L. *et al.* De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *Am. J. Hum. Genet.* **68**, 1327–1332 (2001).
3. Kalume, F., Yu, F. H., Westenbroek, R. E., Scheuer, T. & Catterall, W. A. Reduced Sodium Current in Purkinje Neurons from Nav1.1 Mutant Mice: Implications for Ataxia in Severe Myoclonic Epilepsy in Infancy. *J. Neurosci.* **27**, 11065–11074 (2007).
4. Yamakawa, K. Molecular and cellular basis: insights from experimental models of Dravet syndrome. *Epilepsia* **52 Suppl 2**, 70–71 (2011).
5. Hsiao, J. *et al.* Upregulation of Haploinsufficient Gene Expression in the Brain by Targeting a Long Non-coding RNA Improves Seizure Phenotype in a Model of Dravet Syndrome. *EBioMedicine* **9**, 257–277 (2016).
6. Han, Z. *et al.* Antisense oligonucleotides increase Scn1a expression and reduce seizures and SUDEP incidence in a mouse model of Dravet syndrome. *Sci. Transl. Med.* **12**, 1–15 (2020).
7. Colasante, G. *et al.* dCas9-based Scn1a gene activation restores inhibitory interneuron excitability and attenuates seizures in Dravet syndrome mice. *Mol. Ther.* **28**, 1–19 (2019).
8. Ricobaraza, A., Gonzalez-Aparicio, M., Mora-Jimenez, L., Lumbreras, S. & Hernandez-Alcoceba, R. High-capacity adenoviral vectors: Expanding the scope of gene therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).
9. Mora-Jimenez, L. *et al.* Transfer of SCN1A to the brain of adolescent mouse model of Dravet syndrome improves epileptic, motor, and behavioral manifestations. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **25**, 585–602 (2021).
10. Ricobaraza, A. *et al.* Epilepsy and neuropsychiatric comorbidities in mice carrying a recurrent Dravet syndrome SCN1A missense mutation. 1–15 (2019). doi:10.1038/s41598-019-50627-w
11. Ogiwara, I. *et al.* Nav1.1 haploinsufficiency in excitatory neurons ameliorates seizure-associated sudden death in a mouse model of dravet syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 4784–4804 (2013).