



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Targeting for success: mechanistic insights into microRNA-based gene therapy for Huntington disease

Sogorb Gonzalez, M.

Citation

Sogorb Gonzalez, M. (2023, February 9). *Targeting for success: mechanistic insights into microRNA-based gene therapy for Huntington disease*.

Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3515739>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3515739>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Resumen en Español

La enfermedad de Huntington (EH), también conocida como corea de Huntington, es una grave enfermedad neurodegenerativa y hereditaria causada por una mutación en el exón 1 del gen de la huntingtina (*HTT*). Esta mutación genética da lugar a una proteína huntingtina mutante (mHTT) que contiene una cadena de poliglutamina y que induce procesos tóxicos como la agregación de proteínas y la muerte celular de neuronas. Debido a su causa monogénica y su toxicidad innegablemente asociada a la proteína mutante, la reducción de mHTT se ha convertido en la diana terapéutica de muchas terapias en desarrollo.

Una de las terapias de reducción de mHTT más avanzadas es una terapia génica basada en microARN (miARN), que consiste en un miARN sintético que se une a la secuencia de la HTT (miHTT) e inhibe la expresión de la proteína mHTT tóxica. El miARN sintético es administrado por un virus adenoasociado (AAV), y se conoce como "AAV-miHTT". La administración directa de AAV-miHTT en el cerebro de modelos animales ha demostrado eficacia para reducir la proteína mHTT y rescatar síntomas motores de la enfermedad de Huntington. También se ha demostrado estudios de toxicología en primates que la terapia es segura. Sin embargo, durante los últimos años, estudios relevantes en el campo han demostrado que la patología de la Huntington es más compleja y se están debatiendo nuevas hipótesis sobre la causa de la aparición y progresión de la enfermedad. Además, la falta de eficacia en los primeros ensayos clínicos sugiere que la reducción de la proteína mHTT podría no ser suficiente para retrasar la progresión de la enfermedad.

Esta tesis describe nuevos conocimientos sobre el mecanismo de acción de las terapias génicas basadas en miARN, incluida el ataque de diferentes especies tóxicas de HTT, la propagación terapéutica de miARN entre las células neuronales y el desarrollo de biomarcadores traslacionales para supervisar su efecto en las regiones cerebrales afectadas.

El **Capítulo 1** es una introducción general al campo de la enfermedad de Huntington e incluye un análisis actualizado de las preguntas y desafíos más relevantes para el desarrollo de terapias exitosas. Describimos el *qué*, el *cómo* y *dónde* atacar y tratar la enfermedad y los principales métodos para evaluar la eficacia (*qué tan bueno*) y la toxicidad (*qué tan malo*) para garantizar una traslación óptima de modelos de animales a pacientes.

Cada vez más evidencia indica que, además de la proteína HTT mutante de longitud completa, fragmentos de la huntingtina, como el fragmento del exón 1 (HTTex1) generado por splicing alternativo, son más propensos a agregarse y contribuir a la patología de Huntington. La producción del fragmento HTTex1 tóxico se correlaciona altamente con la expansión de repeticiones CAG, la inestabilidad somática, y su acumulación lenta pero



constante en el tiempo que podría explicar por qué los pacientes con EH desarrollan neurodegeneración y síntomas en la vida adulta. Este hallazgo también sugiere que la reducción de la expresión de HTTex1 podría lograr un mayor beneficio terapéutico que atacando sólo la HTT mutante de longitud completa y, por el contrario, las estrategias que se dirigen exclusivamente a la HTT de longitud completa podrían no prevenir la aparición de la EH. En el **capítulo 2**, evaluamos la capacidad de AAV5-miHTT para reducir los niveles de los fragmentos de HTTex1 en el cerebro de dos modelos de ratones con EH. La administración intra-cerebral de AAV5-miHTT resultó en una reducción significativa tanto de HTT mutante de longitud completa como del fragmento tóxico de HTTex1 en el cerebro (cuerpo estriado y corteza cerebral) de ratones Q175 knock-in y humanizados Hu128/21 a los dos y cuatro meses, respectivamente. Estos resultados demuestran que la terapia génica AAV-miHTT es un tratamiento eficaz para reducir los niveles de HTT de longitud completa y los niveles altamente tóxicos del fragmento HTTex1, y apoya el beneficio terapéutico adicional de los tratamientos dirigidos a la secuencia del exón 1 para la EH.

Uno de los mayores retos en el tratamiento de las enfermedades cerebrales es conseguir una adecuada distribución y cobertura de todas las áreas cerebrales afectadas, así como un efecto sostenido en el tiempo. Para esto, los estudios preclínicos en animales de gran tamaño son importantes para una traslación óptima a los pacientes. En el **capítulo 3**, investigamos la eficacia a largo plazo de AAV-miHTT administrado en el cerebro (cuerpo estriado) en cerdos transgénicos con EH. Demostramos que la administración intra-cerebral de la terapia AAV-miHTT resulta en una reducción generalizada y persistente (hasta 1 año) de la proteína HTT en todas las áreas del cerebro afectadas en EH. También se investigaron posibles biomarcadores para evaluar la expresión y la eficacia terapéutica. Este estudio, junto con estudios de toxicología que demostraron la seguridad de esta terapia, fue esencial para respaldar la aplicación clínica de AAV5-miHTT en pacientes de EH en Mayo de 2021.

En cuanto al mecanismo de acción de AAV-miHTT, en esta tesis presentamos un novedoso mecanismo de secreción y diseminación de terapias génicas facilitadas por vesículas extracelulares (EV). En el **capítulo 4**, investigamos la secreción de miRNA sintéticos y su uso como marcadores terapéuticos para evaluar la expresión y la durabilidad de las terapias génicas en el cerebro. Niveles detectables de miARN sintéticos se midieron en vesículas extracelulares en el líquido cefalorraquídeo de primates hasta 2 años después de la inyección intra-cerebral. Estos resultados respaldan el uso de vesículas extracelulares como marcadores farmacocinéticos en ensayos clínicos de terapias génicas con miRNA sintéticos para enfermedades neurodegenerativas.

La diseminación de terapias más allá de las células tratadas inicialmente podría contribuir a la eliminación de proteínas tóxicas en todas las regiones y células cerebrales afectadas y, finalmente, prevenir la progresión de la enfermedad. En el **capítulo 5**,



investigamos la transferencia funcional por vesículas extracelulares de moléculas de miRNA sintéticos desde células neuronales corregidas por AAV-miARN a células vecinas. Este estudio demuestra la internalización de vesículas extracelulares por parte de las células neuronales y la eficacia de los miRNA sintéticos para reducir los genes diana tras la transferencia a la célula receptora.

Para finalizar, el **capítulo 6** es una revisión de los principales hallazgos de esta tesis en el contexto del campo de la EH y las terapias génicas basadas en miARN para enfermedades neurodegenerativas. Además, debatimos las necesidades y las perspectivas futuras para el desarrollo de una terapia exitosa para la cura de EH y otras enfermedades neurodegenerativas.