



## Titolo progetto:

TARGEIGHT - Targeting frequent F8 mutations with base/prime editors or suppressor tRNAs as innovative therapy for severe Hemophilia

## Abstract:

L'Emofilia A (HA) è una malattia genetica legata al cromosoma X causata da mutazioni nel gene del fattore VIII (FVIII), una proteina chiave della coagulazione del sangue prodotta principalmente dalle cellule endoteliali sinusoidali epatiche (LSEC). La terapia corrente è basata sulla infusione di FVIII esogeno e, a causa della sua breve emivita, richiede somministrazioni frequenti per tutta la vita. Questo aspetto, unito alla complicazione frequente di sviluppo di anticorpi contro il FVIII terapeutico (30% dei casi), ha portato allo sviluppo di approcci alternativi quali FVIII a lunga emivita, agenti "by-passanti", anticorpi mimetici e inibitori degli inibitori fisiologici, alcuni già in clinica. Di recente è stata anche autorizzata una terapia genica basata su un vettore adeno-associato ricombinante capace di guidare la sintesi del FVIII umano dal fegato (Valoctocogene roxaparvovec). La sperimentazione clinica ha mostrato un effetto terapeutico promettente dopo una singola iniezione del virus ma anche un declino dei livelli di FVIII nel corso degli anni, lasciando quindi una questione aperta sulla durabilità della terapia.

In questo progetto pioniero ci si propone di espandere l'arsenale terapeutico per l'HA con due approcci alternativi fondati su due recentissime tecnologie:

- i) **DNA base (BE) e prime (PE) editing** per correggere definitivamente a livello del gene a) mutazioni puntiformi, la causa più frequente di HA ed altre malattie genetiche, e b) la grande inversione dell'introne 22 (F8 IVS22), che causa più del 40% dei casi di HA severa/moderata;
- ii) **"engineered suppressor (ES)-tRNAs"** per correggere l'effetto di mutazioni nonsense, una causa relativamente frequente (>15%) di HA ed altre malattie genetiche.

L'obiettivo finale è di fornire "proof-of-principle" sia in modelli *in vitro* che *ex-vivo* che gli approcci basati su BE/PE e ES-tRNAs possono correggere, rispettivamente a livello di DNA o di sintesi proteica, mutazioni frequenti che causano HA, e portando la tecnologia al livello TRL4, ponendo così le basi per lo sviluppo di terapie innovative per questa patologia e per molte altre malattie genetiche.

## Obiettivi e risultati attesi:

**Gli obiettivi specifici di questo progetto** che propone l'utilizzo di BE/PE/ES-tRNAs su un pannello di mutazioni frequenti nel gene del FVIII e rappresentative di mutazioni nonsense, missenso e di splicing, oltre alla inversione F8 IVS22, sono:

**1)** dimostrarne la correzione sfruttando una piattaforma di espressione ottimizzata (***in-vitro setting***), ed in particolare:

- a) selezionare i BE/PE/ES-tRNAs più efficienti usando un sistema di espressione altamente sensibile basato sulla luminescenza (luciferase-based expression system);

b) valutare la correzione a livello di DNA, RNA e proteina (livelli di FVIII secreto e funzionale) dei BE/PE/ES-tRNAs selezionati in cloni esprimenti stabilmente le varianti geniche mutate;

c) valutare l'abilità dell'approccio PE di revertire la inversione F8 IVS22 in un modello di cellule HEK293 ingegnerizzate per mimare l'inversione;

**2)** dimostrare l'efficienza di correzione, ed impatto su secrezione e funzione del FVIII, di BE/PE/ES-tRNAs in cellule endoteliali sinusoidali epatiche (LSECs) derivate da pazienti emofilici (ex-vivo setting).

Ci attendiamo di fornire la "proof-of-principle" che gli approcci basati su BE/PE e/o ES-tRNAs possono correggere, rispettivamente a livello di DNA o di sintesi proteica, mutazioni frequenti che causano HA, ponendo le basi per studi in modelli animali tesi a verificarne l'efficacia ed ottimizzare il sistema di veicolazione, e portare allo sviluppo di una terapia personalizzata per l'emofilia A. Il tutto portando la tecnologia al livello TRL4, e gettando le basi per lo sviluppo di terapie innovative per questa patologia e per molte altre malattie genetiche dell'uomo.

Da sottolineare che gli approcci di correzione proposti beneficeranno dalle sinergie con altri gruppi del Centro Nazionale "RNA & Gene Therapy" sugli aspetti di i) veicolazione non-virale per una strategia "hit and run" con BE/PE DNA editing, ii) elementi di regolazione per una espressione ristretta a LSECs (track A2) o iii) nuovo modelli animali (i.e Track A3), con potenziali prospettive di sviluppo oltre l'orizzonte del corrente PNRR.