

Una fusione anticorpo-GAA come nuova terapia per la malattia di Lafora

Grant L. Austin, Robert Shaffer, Annette Mestas, Kia H. Markussen, Alberto Rondon, Lyndsay E.A. Young, Alex R. Cantrell, Harrison A. Clarke, Justin R. Kim, Zhengqui Zhou, Nadine M. Aziz, James R. Pauly, Craig W. Vander Kooi, Dustin Armstrong, Ramon C. Sole, Matthew S. Gentry

Astratto

Introduzione

La malattia di Lafora (LD, OMIM #254780) è una forma grave, invariabilmente fatale di neurodegenerazione che si manifesta come demenza infantile con epilessia mioclonica progressiva (Gentry *et al*, 2018; Turnbull *et al*, 2016). La LD è causata da mutazioni autosomiche recessive in *EPM2A* che codifica per la glicogeno fosfatasi laforina; o *EPM2B/NHLRC1* che codifica per l'ubiquitina ligasi E3 malin (Minassian *et al*, 1998; Serratosa *et al*, 1999; Chan *et al*, 2003; Gentry *et al*, 2005; Worby *et al*, 2006; Tagliabracci *et al*, 2007).

I pazienti con LD si sviluppano normalmente per la prima decade di vita e poi mostrano un attacco generalizzato e/o scatti mioclonici (Minassian, 2001; Turnbull *et al*, 2016). Gli episodi epilettici aumentano sia quantitativamente che qualitativamente per il prossimo decennio e il paziente mostra un declino cognitivo drammatico e rapido (Shahwan *et al*, 2005; Minassian, 2001). Le cure palliative con terapie antiepilettiche sono utili durante le prime fasi della LD, ma queste diventano inefficaci man mano che le convulsioni diventano più intrattabili. Circa 10 anni dopo l'insorgenza della malattia, i pazienti scendono in grave demenza infantile con atassia e afasia, entrano in uno stato vegetativo e muoiono per stato epilettico o polmonite da aspirazione (Minassian, 2001; Serratosa, 1999; Turnbull *et al*, 2016). L'età di esordio, la gravità e il tasso di progressione attraverso i sintomi della malattia sono influenzati dalla mutazione specifica del paziente in *EPM2A* o *EPM2B* (Brewer *et al*, 2021).

La carenza di laforina o malin provoca l'accumulo citosolico di aggregati aberranti simili al glicogeno, chiamati corpi di Lafora (LB). Gli LB sono aggregati Periodici Acid-Schiff che colorano positivi (PAS+) nel citoplasma di cellule di quasi tutti i tessuti, inclusi sia i neuroni che gli astrociti (Sullivan *et al*, 2017; Tagliabracci *et al*, 2007, 2008; Duran *et al*, 2020; Augé *et al*, 2018; Duran *et al*, 2021; Rubio-Villena *et al*, 2018). Nel cervello dei modelli murini LD, >90% degli astrociti e ~ 10% dei neuroni contengono LB (Duran *et al*, 2021; Lahuerta *et al*, 2020; Rubio-Villena *et al*, 2018). Si ipotizza che gli LB strocitici siano importanti contributori alla fisiopatologia neurodegenerativa, tra cui l'aumento dell'infiammazione e dell'autofagia, mentre gli LB neuronali sono più direttamente collegati all'attività epilettica (Duran *et al*, 2021). Inoltre, i topi LD mostrano anche un metabolismo del glucosio cerebrale perturbato e una glicosilazione aberrante delle proteine N-linked (Brewer *et al*, 2019b; Markussen *et al*, 2021; Sun *et al*, 2021). Inoltre, i laboratori di Multiple, utilizzando diversi modelli murini LD, hanno dimostrato che gli LB sono l'agente eziologico che guida la malattia (Turnbull *et al*, 2011, 2014; Duran *et al*, 2014; DePaoli-Roach *et al*, 2010; Valles-Ortega *et al*, 2011; Ganesh *et al*, 2002; Pederson *et al*, 2013). Molti laboratori stanno quindi sviluppando terapie mirate agli LB per il trattamento della LD (Gumusgoz *et al*, 2021; Nitschke *et al*, 2021; Markussen *et al*, 2021; Austin *et al*, 2019; Brewer *et al*, 2019b; Tang *et al*, 2020).

Le terapie a base di anticorpi sono utilizzate per trattare numerosi disturbi da immunodeficienza, malattie autoimmuni, cancro e malattie da accumulo di glicogeno (GSD) (Zhou *et al*,2019). Queste terapie presentano una gamma di complessità e funzioni dall'immunoglobulina endovenosa semplicistica agli anticorpi complessi bi- e tri-specifici, fusioni anticorpo-enzima(AEF) e terapia enzimatica profarmaceutica diretta da anticorpi (Zhou *et al*,2019; Elgundi *et al*,2017). La somministrazione di terapie nelle cellule è un ostacolo sostanziale per le terapie biologiche (Rehman *et al*,2016). L'auto-anticorpo anti-DNA 3E10 naturale identificato in un modello murino di lupus eritematoso sistemico, è in grado di trasportare il carico nelle cellule (Hansen *et al*,2005; Weisbart *et al*,1998). L'intero anticorpo 3E10, il suo frammento di legame con l'antigene (Fab) e il suo frammento variabile a catena singola sono stati utilizzati come vettori di carico efficienti per la consegna di proteine terapeutiche in più modelli di malattia senza generare effetti collaterali patogeni (Hansen *et al*,2006, 2007a; Heinze *et al*,2009; Weisbart *et al*,2005; Lawlor *et al*, 2013). L'anticorpo The 3E10 e i suoi derivati penetrano nelle cellule attraverso il trasportatore nucleotidico equilibrante 2 (ENT2, SLC29A2), un recettore chiave nella via di salvataggio nucleosidica, e ottengono l'accesso diretto al citoplasma e al nucleo (Zack *et al*,1996; Weisbart *et al*,2005; Hansen *et al*,2007b) Un frammento di Fab (hFab) umanizzato di 3E10 è stato fuso con l'alfa-amilasi pancreatica umana (AMY2A) di 50 kDa per generare l'AEF VAL-0417. Abbiamo precedentemente dimostrato che VAL-0417 degrada gli LB *in vitro*, ablati gli LB cerebrali nei modelli murini LD quando viene consegnato nei ventricoli cerebrali e normalizza il metabolismo cerebrale nei topi *Epm2a*^{-/-} LD (Austin *et al*,2019; Brewer *et al*,2019b).

Lo stesso 3E10 hFab è stato anche fuso con il 110 kDa proteina dell'acido umano, alfa-glucosidasi (GAA) per creare l'AEF, VAL-1221 (Yi *et al*,2017; Kishnani *et al*,2019). GAA è l'enzima lisosomiale responsabile della scissione dei legami α -1,4- e α -1,6- glicosidici del glicogeno lisosomiale. GAA ottiene l'accesso ai lisosomi attraverso il recettore del mannosio-6-fosfato (M6P). La malattia di Pompe (malattia da accumulo di glicogeno di tipo II) è causata da mutazioni nel gene *GAA* ed è guidata da aberranti accumuli di glicogeno lisosomiale e citoplasmatico in sistemi di più organi, principalmente il muscolo cardiaco e scheletrico (van der Ploeg & Reuser, 2008). I pazienti con malattia di Pompe sono stati trattati con terapia enzimatica sostitutiva dell'acido umano ricombinante alfa-glucosidasi (rhGAA, Alglucosidasi alfa) dal 2006 (REF). Un modello murino di malattia di Pompe trattato sistemicamente con VAL-1221 ha mostrato ridotte inclusioni di glicogeno lisosomiale e citoplasmatico in più tessuti (Yi *et al*,2017). È importante sottolineare che il trattamento con VAL-1221 dei pazienti con malattia di Pompe in fase avanzata ha mostrato esiti clinici promettenti in uno studio clinico di fase I / II senza segnalazione di indicazioni avverse importanti (Clinical trials.gov NCT02898753) (Kishnani *et al*,2019).

Dato il successo di VAL-1221 nel degradare le inclusioni di glicogeno nella malattia di Pompe, studiamod VAL-1221 come metodo per degradare gli LB nei modelli LD . VAL-1221 ha mostrato una robusta capacità *in vitro* di degradare LB purificati da due modelli murini LD e di ottenere l'accesso citoplasmatico in coltura cellulare. Un modello murino LD trattato per via endovenosa con VAL-1221 ha mostrato una significativa riduzione dei carichi LB in più tessuti. È eccitante, la somministrazione intracerebroventricolare di VAL-1221 ha ridotto drasticamente gli LB e normalizzato sia il metabolismo cerebrale che la glicosilazione proteica legata all'N. Pertanto, VAL-1221 è una terapia pre-clinica nuova ed efficace per LD.

Risultati

VAL-1221 degrada LBs in vitro

VAL-1221 ha mostrato efficacia preclinica e clinica nella malattia di Pompe, ma il suo uso in altri GSDs non è stato definito. È importante sottolineare che gli aggregati glicogenici nei pazienti con GSD e nei modelli murini differiscono tra le malattie sia per composizione che per posizione (Ellingwood & Cheng, 2018). Molti GSD sono guidati da aggregati glicogeno-simili aberranti, ma questi aggregati differiscono per quanto riguarda la lunghezza della catena del glucosio, la frequenza di ramificazione e i livelli di fosforilazione del glucosio. Inoltre, questi aggregati possono essere nel lisosoma o citoplasma e molti sono specifici del tessuto. Pertanto, una terapia a base di enzimi deve ottenere l'accesso al compartimento subcellulare appropriato del tessuto corretto ed essere in grado di degradare l'aggregato.

VAL-1221 è un AEF composto dal frammento di catena pesante 3E10 IgG hFab fuso con GAA e con umano espresso con la corrispondente catena leggera 3E10 IgG hFab (Figura 1A). VAL-1221 è stato purificato dai terreni di coltura HEK293-6E mediante cromatografia di affinità e la purezza è stata valutata riducendo e non riducendo SDS-PAGE (Figura 1B). Il peptide di fusione a catena pesante-GAA si dissocia dal peptide a catena leggera con l'aggiunta di β -mercaptoetanol (BME) su un gel riducente che produce due bande distinte di 135 e 25 kDa. In assenza di BME, c'è una banda singola prominente a 160 kDa che corrisponde alla fusione hFab-GAA intatta. L'attività specifica di VAL-1221 è stata confrontata con rhGAA utilizzando un saggio cinetico con 4-metilumbelliferil- α -D-glucopiranoside (4-MU-GP) come substrato, che viene convertito in glucopiranoside e un prodotto fluorescente, il 4-metilbelliferone. L'attività di VAL-1221 è stata identica a rhGAA per tutta la durata del test (Figura 1C).

Data la robusta attività di VAL-1221 contro il substrato artificiale 4-MU-GP, abbiamo testato l'attività di VAL-1221 contro LB purificati da modelli murini di laforin KO e malin KO. VAL-1221 ha mostrato una robusta attività contro LB di entrambi i modelli murini LD (Figura 1D). I prodotti rilasciati da questa degradazione sono stati determinati mediante cromatografia a scambio anionico ad alte prestazioni accoppiata con rilevamento amperometrico pulsato (HPAEC-PAD) da aliquote prelevate dalle digestioni a 24, 48, 72 e 168 ore. Il principale prodotto della digestione LB con VAL-1221 era il glucosio e il successivo prodotto più abbondante era il maltosio (Figura 1F, Figura supplementare 1, Tabella supplementare 1). Inoltre, gli LB sono stati digeriti *in vitro* con VAL-1221 o PBS per 72 ore e visualizzati al microscopio ottico con l'utilizzo dello iodio di Lugol 10X (Figura 1G). Cumulativamente, questi dati dimostrano che VAL-1221 digerisce robustamente gli LB *in vitro* rilasciando principalmente glucosio.

VAL-1221 Assorbimento in vitro e in vivo

Per degradare gli LB, VAL-1221 deve penetrare nella membrana cellulare e accedere al citoplasma. VAL-1221 è stato progettato per entrare nelle cellule attraverso il recettore M6P e il trasportatore ENT2. Il recettore M6P si trova sulla superficie cellulare e trasporta le proteine ai lisosomi attraverso gli endosomi. ENT2 è un trasportatore al nucleosidico bidirezionale che si trova sulla maggior parte dei tipi di cellule. Per valutare l'ingresso di VAL-1221 nelle cellule, i mioblasti di topo C2C12 sono stati trattati con 50 μ g/mL VAL-1221 o PBS per 4 o 24 ore, e quindi VAL-1221 è stato ripreso tramite immunofluorescenza. Dopo il trattamento, le cellule sono state fissate, VAL-1221 è stato rilevato utilizzando un nanocorpo anti-Fab, gli lisosomi sono stati visualizzati utilizzando un anticorpo anti-LAMP2 e i nuclei sono stati colorati con DAPI. In particolare, VAL-1221 è stato osservato in gran parte nel

citoplasma in entrambi i punti temporali con aumento della colocalizzazione lisosomiale dopo 24 ore (Figura 2A).

Per valutare la biodistribuzione di VAL-1221 *in vivo*, VAL-1221 e rhGAA sono stati radiomarcati by ione coniugato chimico con ⁸⁹Zr. rhGAA entra nelle cellule attraverso il recettore M6P ma manca del 3E10 hFab e quindi non impegna il trasportatore ENT2 per entrare nelle cellule. Ai topi WT sono stati somministrati radiomarcati VAL-1221 o rhGAA mediante iniezione della vena della coda (e.v.). 120 ore dopo la somministrazione i topi sono stati eutanazzati e il cuore, il cervello, i quadricipiti, il fegato e la milza sono stati raccolti. La radioattività dei tessuti raccolti è stata quantificata ed è stata calcolata la percentuale di dose iniettata per grammo di ciascun tessuto. Come previsto, la maggior parte di rhGAA e VAL-1221 è stata rilevata nel fegato e nella milza (Figura supplementare 2). Sorprendentemente, la percentuale di dose iniettata erogata al cuore, ai muscoli e ai tessuti cerebrali era significativamente più alta per VAL-1221 rispetto a rhGAA (Figura 2B). Questi dati dimostrano che VAL-1221 penetra nelle cellule e ottiene l'accesso al citoplasma sia *in vitro* che *in vivo*.

VAL-1221 degrada gli LB sistemici nei topi LKO dopo somministrazione endovenosa

Elevati carichi di LB sono stati riportati nel cuore e nei tessuti muscolari scheletrici da modelli murini LD e pazienti con LD (Villalba-Orero *et al*, 2017; Wick & Byard, 2006). Per valutare la vitalità e l'efficacia di VAL-1221 nel degradare LB *in vivo*, abbiamo somministrato VAL-1221 a **topi (non conosco le età)** tramite i.v. I topi WT e LKO hanno ricevuto iniezioni per 0,2 mL di 10 mg / mL VAL-1221 o PBS nei giorni 1, 4, 8 e 12 (Figura 3A). I topi sono stati sottoposti a eutanasia il giorno 13 e i tessuti del cuore e del quadricipite sono stati rapidamente sezionati e lavati con PBS. I tessuti sono stati divisi con metà flash congelato in azoto liquido per l'analisi biochimica e l'altra metà formalina colorazione PAS fissa. Val-1221 ha ridotto drasticamente i livelli totali di polisaccaridi nel cuore e nei quadricipiti (Figura 3B-C). Al contrario, i livelli di polisaccaride totale erano simili per i topi WT indipendentemente dal trattamento e questi livelli erano coerenti con i precedenti rapporti per i topi C57BL/6 (Figura 3B-C) (Tagliabracci *et al*, 2008). Lesioni cardiache colorate con PAS fissate erano coerenti con la quantificazione biochimica dei polisaccaridi con tessuto fisso che mostrava marcate diminuzioni di LB PAS+ nel tessuto cardiaco LKO trattato con VAL-1221 (Figura 3D). Questi dati dimostrano che dopo l'iniezione endovenosa, VAL-1221 penetra nelle cellule, ottiene l'accesso al citoplasma, è attivo e degrada gli LB *in vivo*.

Intracerebroventricular Administration of VAL-1221 Ablates Brain LBs

Data pre-clinici da più laboratori che utilizzano diversi modelli murini LD indipendenti hanno dimostrato che gli LB cerebrali causano epilessia e neurodegenerazione LD (Valles-Ortega *et al*, 2011; Duran *et al*, 2012, 2014, 2021; García-Cabrero *et al*, 2012; Brewer *et al*, 2019b). Poiché i farmaci a base di anticorpi monoclonali non attraversano la barriera emato-encefalica (Zuchero *et al*, 2016), la somministrazione subdurale di VAL-1221 nel cervello o nel midollo spinale è probabilmente necessaria per penetrare in modo efficiente nel parenchima cerebrale e degradare gli LB cerebrali (Zhou *et al*, 2019; Kumar *et al*, 2018). La somministrazione intracerebroventricolare (i.c.v.) si è dimostrata sicura nelle popolazioni pediatriche e adulte per la somministrazione di Cerliponase Alfa

per la lipofuscinosi ceroide neuronale tardiva-infantile di tipo 2, antibiotici per la meningite e chemioterapia per vari tumori (Cohen-pfeffer *et al*, 2017; Slavic *et al*, 2018; Lewis *et al*, 2020).

Per fornire VAL-1221 al cervello, i.c.v. le cannule sono state impiantate nel ventricolo laterale di topi LKO di 7 mesi e attaccate a una pompa osmotica sottodermica impiantata nel collo posteriore. L'i.c.v. ha somministrato un'infusione continua di VAL-1221 (0,03 mg/die) o PBS. I topi hanno ricevuto la somministrazione continua di VAL-1221 o PBS per 48- o 168-ore (2 o 7 giorni) e poi sono stati eutanassati (Figura 4A). Dopo l'eutanasia, i cervelli sono stati rapidamente rimossi ed emessi lungo la fessura longitudinale mediale. L'emisfero sinistro è stato fissato in formalina tamponata neutra per la colorazione PAS e l'emisfero destro è stato congelato e polverizzato in azoto liquido per l'analisi biochimica.

Per valutare se VAL-1221 è stato consegnato con successo al cervello dopo la somministrazione i.c.v., gli omogeneizzati cerebrali sono stati analizzati utilizzando un test di attività enzimatica immunocatrizzata utilizzando 4-MU-GP come substrato (Figura supplementare 3). Livelli robusti di VAL-1221 sono stati rilevati da campioni di cervello a cui è stato somministrato il farmaco per 168 ore e basso rilevamento dopo 48 ore. Sono stati rilevati i livelli possibili in campioni di cervello trattati con PBS (Figura 4B). Gli omogeneizzati cerebrali sono stati quindi valutati per i livelli totali di polisaccaridi tramite un metodo recentemente stabilito che utilizza la spettrometria di massa per gascromatografia (GCMS) (Young *et al*, 2020). I topi trattati con VAL-1221 hanno mostrato una leggera riduzione dei livelli totali di polisaccaridi dopo 48 ore e livelli significativamente ridotti dopo 168 ore di trattamento (Figura 4C). I livelli di polisaccaridi negli animali trattati con PBS sono rimasti costanti in entrambi i punti temporali (Figura 4C).

I cervelli LKO con colorazione PAS e fissati con formalina trattati con PBS hanno mostrato un'abbondanza di LB ai timepoint di 48 ore e 168 ore in tutte le regioni del cervello, tra cui la corteccia, il talamo, il cervelletto e il tronco cerebrale (Figura 4D e 5). La piattaforma di patologia digitale HALO è stata utilizzata per quantificare i carichi LB nella regione del cervello e nell'intero cervello. Negli animali trattati con PBS, gli LB erano più abbondanti nel cervelletto e nel tronco cerebrale con la corteccia frontale e il talamo che mostravano anche un elevato carico di LB (Figura 5 e Figura supplementare 4). I carichi di LB sono diminuiti drasticamente in tutte le regioni del cervello dopo 168 ore di trattamento con VAL-1221 (Figura 5 e Figura supplementare 4).

i.c.v La somministrazione di VAL-1221 normalizza la glicosilazione metabolica e legata all'N nei topi LKO

Il glicogeno è catabolizzato in glucosio-1-fosfato, convertito in glucosio-6-fosfato (G6P) e G6P è un substrato per una miriade di vie metaboliche come la glicolisi, la via del pentoso fosfato e la sintesi degli aminoacidi, direttamente o indirettamente. L'interruzione del metabolismo del glucosio contribuisce a molteplici interruzioni fisiologiche tra cui la disregolazione dei neurotrasmettitori (Duran *et al*, 2021; Markussen *et al*, 2020).

La metabolomica *targeted* viene utilizzata per la scoperta di biomarcatori, definendo le perturbazioni della rete e stabilendo meccanismi molecolari che guidano le malattie metaboliche (Chen *et al*, 2019; Liu *et al*, 2018; Tasdogan *et al*, 2020; Dang *et al*, 2009; Ward *et al*, 2010; Kind *et al*, 2007; Claudino *et al*, 2007; Sellers *et al*, 2015). Abbiamo precedentemente dimostrato che i topi LKO mostrano perturbazioni nel metabolismo centrale del carbonio che generano una firma metabolica unica (Brewer

et al,2019b). Per valutare l'efficacia del trattamento di VAL-1221, abbiamo impiegato GCMS per valutare i metaboliti centrali del carbonio della glicolisi, la via del pentoso fosfato, il ciclo dell'acido tricarbossilico (TCA) e il metabolismo degli aminoacidi (Fiehn *et al*,2000; Fiehn, 2016; Kind *et al*,2009). I metaboliti polari sono stati estratti dal tessuto cerebrale polverizzato dei topi LKO trattati con PBS o VAL-1221 via i.c.v. per 48 e 168 ore. Abbiamo identificato >100 metaboliti di tutti i gruppi che sono stati utilizzati nell'analisi di clustering supervisionata per valutare i profili metabolici complessivi. I metabolomici cerebrali WT non trattati e LKO non trattati erano distinti, coerenti con i risultati precedenti (Figura 6A) (Brewer *et al*,2019b). Il profilo metabolico dei topi LKO trattati con VAL-1221 si è spostato più strettamente verso gli animali WT non trattati (Figura 6A). Al contrario, i topi trattati con LKO PBS hanno mostrato un profilo distinto da tutti gli altri gruppi, probabilmente riflettendo i cambiamenti metabolici causati dalla chirurgia i.c.v. (Duran *et al*, 2021). Il clustering della mappa di calore ha ulteriormente confermato i risultati di sPLSDA. Il profilo metabolico dei topi LKO trattati con VAL-1221 era principalmente intervallato da profili WT mentre il profilo metabolico dei topi LKO trattati con PBS era più simile a LKO non trattato (Figura 6B).

Recentemente, è stato dimostrato che il glicogeno cerebrale è composto da ~20% di glucosamina e l'interruzione della capacità della glucosamina di essere rilasciata dal glicogeno provoca una disregolazione critica della glicosilazione legata all'N (Sun *et al*,2021). È stato anche riportato che la glucosamina è sequestrata in LB e che i topi LKO mostrano modelli di glicosilazione anormali nel cervello. Abbiamo valutato i modelli di glicosilazione legata all'N del cervello utilizzando la spettrometria di massa per immagini a desorbimento/ionizzazione laser assistita da matrice (MALDI-IMS) per visualizzare sezioni di cervelli di topo LKO i.c.v. somministrati con VAL-1221 o PBS per 168 ore rispetto ai cervelli WT e LKO non trattati (Figura 7 e Figura supplementare 5). I grafici sPLSDA mostrano profili glicani distinti nei topi WT e LKO in cinque diverse regioni del cervello (tronco cerebrale, cervelletto, talamo, ippocampo e corteccia). I grafici sPLSDA mostrano inoltre che quando trattato con VAL-1221, il profilo glicano N-linked dei topi LKO in ogni regione valutata, diventa indistinguibile dal profilo WT, tuttavia, il trattamento PBS non restituisce il profilo di glicosilazione N-linked dei topi LKO a WT. Dai dati che compongono il profilo totale di glicosilazione legata all'N visto nel grafico sPLSDA, siamo stati in grado di creare grafici di punteggio VIP per analizzare i glicani che sono stati più modificati all'interno di ciascuna regione. È interessante notare che diversi glicani costituivano il gruppo più significativamente modificato nelle varie regioni, suggerendo che le diverse regioni del cervello hanno specifici profili di glicosilazione legati all'N. Tuttavia, i glicani fucosi core sembravano costituire la maggior parte dei glicani significativamente modificati, probabilmente indicando alcuni percorsi di elaborazione del glicano specifici del cervello che non sono specifici della regione. In effetti, le immagini rappresentative MALDI-IMS dei glicani più modificati dal grafico del punteggio VIP, dimostrano che il trattamento VAL-1221 ripristina la glicosilazione legata all'N specifica della regione. Insieme, i dati di metabolomica GCMS e i dati di distribuzione del glicano MALDI-IMS mostrano che VAL-1221 ripristina il cervello dei topi LKO in uno stato WT dopo sette giorni di somministrazione ICV.

Discussione

LD è un GSD con pazienti che presentano epilessia mioclonica intrattabile e demenza infantile che deriva dall'accumulo di LB aberranti simili al glicogeno. Poiché è ben noto che gli LB guidano la progressione della malattia, gli LB sono un obiettivo chiave per le terapie LD che sono in fase di sviluppo

(Brewer *et al*,2019a, 2019b; Gentry *et al*,2020; Markussen *et al*,2021). In questo studio, dimostriamo l'efficacia pre-clinica di una nuova terapia AEF per LD. Utilizzando multiple tecniche consolidate e nuove, stabiliamo che VAL-1221 degrada LB attraverso il dominio GAA e penetra nelle cellule in più tessuti. Upon i.v. administration, VAL-1221 degrada LB del tessuto muscolare e cardiaco nei topi LD. È importante sottolineare che la somministrazione per via endovenosa di VAL-1221 ha portato a LB ablati in più regioni del cervello topi LD. Infine, dimostriamo che la somministrazione di VAL-1221 i.c.v. normalizza il profilo metabolico dei cervelli LD mouse e ripristina la glicosilazione legata a N simile a WT.

Lo sviluppo di una terapia enzimatica sostitutiva tradizionale (ERT) per LD non è una scelta ottimale poiché può essere causato dalla perdita di laforina o malin. Le strategie precliniche di terapia genica LD sono in fase di sviluppo e i primi risultati sono promettenti (Vemana *et al*,2021), tuttavia, il raggiungimento di una distribuzione capillare del cervello ha dimostrato solo di recente di essere fattibile negli esseri umani (Thomsen *et al*,2021). Una terapia con oligonucleotidi antisenso (ASO) per la LD mirata alla glicogeno sintasi (Gys1) ha mostrato risultati promettenti nell'inibire la progressione della LD in modelli murini pre-clinici (Gumusgoz *et al*,2021; Ahonen *et al*,2021). L'ASO impedisce agli LB di svilupparsi, ma gli LB presenti prima del trattamento rimangono e non sono degradati. Pertanto, la terapia ASO probabilmente fermerebbe la progressione della malattia, ma farebbe poco per invertire le manifestazioni della malattia già presenti nei pazienti (Nitschke *et al*,2021; Gumusgoz *et al*,2021; Ahonen *et al*,2021). Questo risultato dell'arresto della progressione della malattia è stato osservato con il farmaco ASO per l'atrofia muscolare spinale (SMA), nusinersen, che ha portato all'implementazione dello screening neonatale per la SMA in modo che i pazienti possano essere trattati il prima possibile (Finkel *et al*,2017; Mercuri *et al*,2018; Kemper *et al*,2018; Ojala *et al*,2021).

La biodisponibilità è un fattore importante nello sviluppo di qualsiasi terapia, incluso VAL-1221. VAL-1221 penetra nelle cellule *in vitro*, il che è coerente con i precedenti esperimenti IF (Yi *et al*,2017). Inoltre, mostriamo che quando viene somministrato per via sistemica, VAL-1221 ottiene l'accesso a più tipi di tessuto ed è attivo all'interno di quei tessuti. È importante sottolineare che per LD, VAL-1221 raggiunge un'ampia biodistribuzione attraverso tutte le regioni del cervello e penetra in profondità nel parenchima quando somministrato tramite i.c.v. La colorazione PAS specifica della regione e l'imaging del glicano legato all'N dimostrano che VAL-1221 è attivo in più regioni del cervello a causa della riduzione degli LB e della correzione dei profili glicanici.

Come molti modelli murini di malattie umane, i modelli murini LD non rispecchiano completamente la condizione umana (Perlman, 2016; Ganesh *et al*,2002; García-Cabrero *et al*,2012; Sánchez-Elexpuru *et al*,2017). Mentre i topi LD sviluppano LB e sono più sensibili ai farmaci che inducono convulsioni, non mostrano frequenti convulsioni spontanee, né mostrano una durata della vita ridotta. In alternativa, c'è una tendenza emergente che i modelli murini condividono firme metaboliche simili con la loro rispettiva malattia umana. Somiglianze metaboliche tra esseri umani e topi sono state riportate per il morbo di Alzheimer, la malattia di Huntington e XXX. I topi LKO hanno una firma metabolica unica rispetto ai metaboliti centrali del carbonio, il che non sorprende dato che il metabolismo del glicogeno influisce su più vie metaboliche (la cellula di Katy ha incontrato il 2019, la nostra revisione delle tendenze del 2021, qualcos'altro che collega il glicogeno al metabolismo). Oltre a una firma metabolica, i topi LKO mostrano una drammatica ipoglicosilazione delle proteine cerebrali (Ramon 2021 call met). To definire l'efficacia di VAL-1221, abbiamo valutato i profili metabolomici e i modelli di glicosilazione cerebrale nei topi LD con e senza trattamento con VAL-1221. VAL-1221 ha normalizzato il profilo

metabolico e la glicosilazione cerebrale dei topi LKO. Va notato che il trattamento PBS ha anche influenzato entrambi i profili, indicando un effetto causato dall'intervento stesso. Questo effetto è probabilmente dovuto al fatto che i marcatori neuroinfiammatori sono elevati dopo la chirurgia i.c.v. La dimensione chirurgica e l'impatto dell'intervento chirurgico su un topo è proporzionalmente molto più grande della chirurgia i.c.v. su un essere umano ed è ben riportato che i.c.v. è ben tollerato nella clinica (Cohen-pfeffer *et al*, 2017; Slavic *et al*, 2018; Lewis *et al*, 2020). Pertanto, gli effetti della chirurgia da soli potrebbero non essere così significativi come osservare in questo studio.

Mentre VAL-1221 abla le lb cerebrali e normalizza la fisiologia del cervello nei topi LD, qui ci sono domande senza risposta riguardanti il trattamento VAL-1221 e LD che devono essere definite. In primo luogo, il tasso di accumulo di LB negli esseri umani e nei modelli LD non è stabilito. Queste informazioni sono cruciali per la creazione di un regime terapeutico permanente di VAL-1221 per la LD. Inoltre, devono essere definiti confronti tra la somministrazione continua di VAL-1221 con un programma di iniezione singola ripetuta. Una volta che gli LB sono ablati, anche il tasso di riaccumulazione deve essere definito. La definizione di questi parametri aiuterà a determinare il regime di dosaggio ideale e se i pazienti con LD richiederanno iniezioni attraverso una porta come la malattia CLN2 o una pompa indossabile simile a una pompa per insulina.

Poiché VAL-1221 è una delle molteplici strategie di trattamento valutate contemporaneamente, una terapia di combinazione può rivelarsi la più ottimale per controllare la progressione della LD e alleviare i sintomi. VAL-1221 LB ablated e la terapia ASO mirata a Gys1 inibiscono la formazione di LB. Le attuali terapie ASO prevedono iniezioni intratecali ogni sei-dodici mesi. Quindi, si potrebbe immaginare una combinazione in cui VAL-1221 viene somministrato al SNC per rimuovere lb in un singolo trattamento e quindi viene fornita una terapia ASO ogni sei-dodici mesi. Attualmente, i medici si concentrano sui sintomi correlati al SNC date le convulsioni dei pazienti con LD e la demenza. I GSD in cui i pazienti presentano aggregati di glicogeno in organi non appartenenti al SNC in genere mostrano patologia nell'organo che contiene gli aggregati, cioè fegato, muscolo scheletrico e / o cuore. Se gli LB LD sono ablati e i sintomi del SNC sono controllati, allora è possibile che i pazienti con LD possano sviluppare manifestazioni cardiache simili ai pazienti familiari di Wolff-Parkinson-White e / o deperimento muscolare simile ai pazienti con malattia di Pompe. In effetti, c'è un rapporto di ipertrofia cardiaca in un modello murino LD (Villalba-Orero *et al*, 2017). VAL-1221 dovrebbe essere ben posizionato per degradare gli LB sistemici dati i dati pre-clinici in questo studio e lo studio clinico sulla sicurezza della malattia di Pompe recentemente completato (NCT02898753).

Il suo studio fornisce ampie prove pre-cliniche che VAL-1221 è una valida opzione terapeutica per il trattamento della LD. VAL-1221 degrada gli LB che sono la causa patognomica della LD e normalizza il metabolismo cerebrale e la glicosilazione dei topi LD. Gli strumenti che abbiamo evidenziato e sviluppato in questo studio saranno cruciali andando avanti mentre VAL-1221 entra negli studi in altri organismi e alla fine entra negli studi clinici. Inoltre, VAL-1221 ha mostrato efficacia in modelli preclinici di due diversi GSD: LD nel presente studio, e in precedenza in un modello murino di malattia di Pompe (Yi *et al*, 2017)). I dati, insieme all'evidenza che rhGAA da solo (attuale ERT per la malattia di Pompe) è utile per alleviare i sintomi nella sindrome PRKAG2 (Austin *et al*, 2017) dimostrano che le terapie che degradano gli accumuli di glicogeno come VAL-1221 hanno un futuro nel trattamento dei GSD di milioni di utopie, che hanno un impatto su 1:20.000 pazienti.

Metodi

Espressione e purificazione di VAL-1221

VAL-1221 è stato progettato e prodotto da Enable Therapeutics (Framingham, MA) (Brewer *et al*, 2019b). Il cDNA che codifica la catena pesante IgG1 Fab-linker-rhGAA e la catena leggera kappa umanizzata sono stati prodotti sinteticamente con ottimizzazione del codone per l'espressione delle cellule di mammifero e clonati in pTT5. Cellule HEK293 che esprimono una variante troncata dell'antigene nucleare 1 del virus di Epstein-Barr (HEK293-6E) per aumentare la resa volumetrica di anticorpi monoclonali e frammenti sono stati utilizzati per l'espressione di VAL-1221 (Jäger *et al*, 2013). Due colture da 1 L di cellule HEK293-6E in palloni da 2 L sono state trasferite con 1 mg di coltura totale di DNA/L plasmidico in un rapporto 1:1 catena pesante:catena leggera utilizzando Q-PEI lineare PolyPlus a un rapporto DNA/PEI 1:1,5 (w/v). I parametri di coltura sono stati monitorati per densità e temperature were raccolti 5 giorni dopo la trasfezione tramite centrifugazione per 5 minuti a 1000 x g. Il surnatante di coltura condizionato è stato chiarito mediante centrifugazione per 30 minuti a 9300 x g. Le colonne di affinità CaptureSelect IgG-CH1 preconfezionate (Fisher) sono state bilanciate in PBS (pH 7,2). VAL-1221 da 2 L di surnatante esausto è stato caricato dall'alto su colonne di affinità (colonne 2x1 mL in tandem) a 4 °C durante la notte. La colonna è stata lavata con circa 15 volumi di colonna (CV) di PBS, 15 CV di tampone B (13 PBS con 500 mM NaCl, pH 7,2) e 15 CV di PBS. La proteina di fusione legata alla resina è stata eluita con 10 CV di Tampone C (30 mM NaOAc, pH 3,5-3,6), raccogliendo la proteina in frazioni da 1 mL, e diluita in 1/10 ° volume Tampone D (3 M NaAcetato pH ~ 9,0) per neutralizzare. Per ridurre al minimo il volume di eluizione, l'eluizione è stata sospesa per diversi minuti tra ogni frazione raccolta. Le frazioni sono state analizzate da A₂₈₀ prima delle frazioni di pooling e le piscine sono state analizzate da SDS-PAGE. VAL-1221 è rimasto nel pool non legato dal primo passaggio di cromatografia di affinità. La procedura di cui sopra è stata ripetuta per catturare la proteina di fusione rimanente. I pool di affinità sono stati combinati prima della dialisi. Il pool di affinità combinato CaptureSelect IgG-CH1 (18 mL) è stato dializzato contro 3x1 L di tampone di dialisi (20 mM istidina, 150 mM NaCl, pH 6,5) a 4 °C. Il pool dializzato è stato concentrato a 1 mg/mL utilizzando un dispositivo centrifugo VivaSpin 20 (10K MWCO, membrana PES) prima dell'analisi finale e dello stoccaggio a -80 °C. Il VAL-1221 purificato è stato analizzato mediante cromatografia ad esclusione dimensionale (Agilent HP1100) che mostra un singolo picco prima e dopo un ciclo di congelamento-disgelo, indicativo di una specie monodispersa e stabile.

Mouse linee e cura

I modelli murini utilizzati in questo studio includevano topi C57BL/6 WT, topi LKO (*Epm2a*^{-/-}) (Ganesh *et al*, 2002), MKO (*Epm2b*^{-/-}) (DePaoli-Roach *et al*, 2010) e topi CD1 IGS WT (Charles River Laboratories, Inc Wilmington, MA). I topi C57BL / 6 WT, LKO e MKO sono stati ospitati presso l'Università del Kentucky (Regno Unito) e i topi CD1 IGS sono stati ospitati presso l'Università della California, San Francisco (UCSF). Tutti i topi sono stati alloggiati in un ciclo luce-buio di 12:12 ore e hanno avuto accesso *ad libitum* a cibo e acqua. Topi maschi e femmine sono stati usati in modo intercambiabile in questi studi in quanto non ci sono differenze di sesso in LD (Gentry *et al*, 2018). Tutte le procedure e gli alloggi effettuati nel Regno Unito sono stati approvati dal Comitato istituzionale per la cura e l'uso degli animali del Regno Unito (IACUC) come specificato dalla revisione del 1985 dell'Animal Welfare Act. UCSF è accreditato dall'American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) e tutte le procedure e gli alloggi effettuati presso l'UCSF hanno soddisfatto o superato i requisiti dalla revisione del 1985 dell'Animal Welfare Act.

Saggio di attività VAL-1221

L'attività di VAL-1221 è stata eseguita con un protocollo simile a quello già stabilito per l'attività GAA (Khanna *et al*, 2012). VAL-1221 e rhGAA sono stati incubati in un patè nero Costar 3915 non trattato a 96 pozzetta 37°C in un lettore di piastre fluorescenti cinetiche con il substrato 4-metilbelliferil- α -D-glucopiranoside (4-MU-GP). 4-MU-GP è stato preparato a 4,2 mM in 0,2 M di sodio acetato triidrato soluzione pH 4,5. La fluorescenza è stata determinata utilizzando lunghezze d'onda Ex360/Em460 nm con letture ogni 5 minuti per 1 ora a partire dal momento in cui è stato aggiunto il substrato 4-MU-GP. L'attività è stata determinata utilizzando una curva standard di 4-metilbelliferone.

Saggio di degradazione dell'omogeneità cerebrale

I topi LKO e MKO sono stati eutanassati da CO₂ e decapitazione. I cervelli sono stati sezionati e congelati con azoto liquido (LN₂). Il tessuto cerebrale congelato è stato polverizzato su LN₂ utilizzando un Freezer/Mill Cryogenic Grinder (SPEX SamplePrep). Il tessuto in polvere è stato risospeso in 4 volumi tampone di acetato di sodio 0,2 M e diviso in due aliquote: trattamento e controllo omogeneizzati. VAL-1221 è stato aggiunto agli omogeneizzati di trattamento ad una concentrazione finale di 0,05 mg/mL ed è stato aggiunto un volume uguale di PBS per controllare gli omogeneizzati. Il trattamento e il controllo degli omogeneizzati sono stati incubati a 37°C per 72 ore su un rotatore. Dopo le incubazioni, gli omogeneizzati sono stati centrifugati per 5 minuti a 16.000 x g. Il surnatante è stato separato in frazioni polari e non polari utilizzando il 50% di metanolo / cloroformio (V / V 1: 1) e la frazione polare è stata analizzata per la concentrazione di glucosio con GCMS come descritto in precedenza (Young *et al*, 2020). In breve, la frazione polare è stata picchiata con una quantità nota di L-norvalina (come controllo interno) e quindi essiccata usando una centrifuga a vuoto a 10⁻³ mBar. La frazione essiccata è stata derivatizzata utilizzando metossiamina in piridina seguita da aggiunta sequenziale di N-metil-trimetilsilazione utilizzando MSTFA. I campioni derivati sono stati quantificati sul GCMS.

Purificazione LB

La purificazione degli LB nativi è stata effettuata come descritto in precedenza (Brewer *et al*, 2019b). I topi LKO sono stati eutanassati da lussazione cervicale e decapitazione e il cervello è stato rapidamente sezionato e congelato su LN₂. Il tessuto congelato è stato polverizzato in LN₂ utilizzando una smerigliatrice criogenica SPEX SamplePrep. Il tessuto polverizzato è stato poi omogeneizzato su ghiaccio con tampone di lisi (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 0,5% azide di sodio) con un omogeneizzatore Dounce. L'omogeneizzato è stato centrifugato per 10 minuti a 10.000 x g e 4°C, il surnatante è stato rimosso e il pellet è stato risospeso in tampone di lisi con aggiunta di SDS e Proteinasi K a concentrazioni finali rispettivamente dello 0,2% e 0,4 mg/mL. La digestione proteolitica è stata eseguita durante la notte a bagnomaria a 37 ° C. I campioni digeriti sono stati filtrati con siringa in sequenza attraverso filtri a rete di nylon da 140 μ m e 60 μ m e quindi centrifugati a 16.000 x g per 5 minuti e il pellet risospeso in SDS al 10%. Gli LB sono stati poi lavati 5 volte in tampone LB (10 mM HEPES-KOH pH 8,0, 0,1% azide di sodio) centrifugando a 16.000 x g per 5 minuti e quindi risegregando nel tampone LB. I pellet LB finali sono stati risospesi nel buffer LB e conservati a -20 ° C.

Degradazione LB in vitro e microscopia ottica di Lugol

Gli LB purificati dalla pioggia LKO bdi topo sono stati digeriti con 10 µg di VAL-1221 o PBS per 7 giorni a 37°C in tamponedi reazione (5 mM di sodio acetato pH 5,4, 7,5 mM NaCl, 0,2 mM CaCl₂) su un rotatore. Dopo la digestione, i campioni sono stati centrifugati a 16.000 xg per 10 minuti e risospesi in 20 µL di PBS. 5 µL di LB di sospensione sono stati miscelati con 5 µL di diluente di 20X Lugol (1,5 M KI e 100 mM I₂) e messi su un vetrino con coprire. Gli LB sono stati visualizzati con un microscopio Nikon Eclipse E600 utilizzando il software di visione Axio.

Determinazione HPAEC-PAD dei prodotti di degradazione

HPAEC-PAD è stato eseguito come descritto in precedenza (Brewer *et al*, 2019b). In breve, 80 µg di LB purificati sono stati trattati con 2,67 µg di VAL-1221 in tampone di degradazione (30 mM HEPES-KOH pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂) ad una concentrazione finale di LB a 1 µg/µL. Le digestioni sono state effettuate in triplice copia a 37 °C. 20 campioni di µL sono stati rimossi a intervalli di 24, 48 e 72 ore seguiti dall'aggiunta di 2,67 µg di VAL-1221 dopo ogni estrazione. Le aliquote sono state conservate a -20 °C fino a quando non sono state eseguite. Le reazioni sono state continuate a 37 °C per 168 ore. Gli ampliconi sono stati profilati utilizzando una colonna CarboPac PA-100 (Thermo-Dionex, 43 250 mm) e rilevati con il rilevatore PAD. 5 µL di campioni di ogni punto temporale sono stati iniettati sulla colonna. Gli LB non digeriti nel buffer sono stati iniettati come controlli. Il glucosio e il maltosio nelle reazioni di degradazione sono stati quantificati utilizzando standard di quantità nota. La profilazione degli oligosaccaridi è stata standardizzata utilizzando 5 µg di Maltrin100.

Coltura cellulare e IF

I mioblasti di topo C2C12 (ATCC) sono stati coltivati DMEM con il 10% di FBS a 37 °C sotto il 5% di CO₂. Al 75% di confluenza, è stato aggiunto VAL-1221 (concentrazione finale di 50 µg/mL) o PBS, le cellule sono state incubate per 4 e 24 ore, quindi fissate e fotografate. Le cellule sono state fissate in paraformaldeide al 4% e permeabilizzate con Tween allo 0,2% (Bio-Rad) in PBS pH 7,4. Un nanocorpo anti-Fab proprietario con tag FLAG è stato incubato per 1 ora a 37 °C alla diluizione 1:100 in siero di capra al 10% in PBS. I vetrini sono stati lavati tre volte e un anticorpo secondario anti-FLAG di coniglio (Invitrogen) e un anticorpo primario anti-LAMP2 di ratto (Cayman Chemical) sono stati incubati durante la notte a 4 °C entrambi a una diluizione di 1:200. Dopo il lavaggio, un anticorpo secondario AlexaFluor488 anti-ratto di capra (Invitrogen) e un anticorpo terziario AlexaFluor546 anti-coniglio di capra (Invitrogen) sono stati incubati per 45 minuti a 37 °C entrambi a una diluizione 1:200. Dopo il lavaggio finale, gli slip di copertura sono stati montati utilizzando Vectashield con DAPI (Vector Labs). L'imaging è stato eseguito con una fotocamera Echo Revolve e un software (ECHO). Tutti i gruppi di trattamento sono stati ripresi con lo stesso tempo di esposizione e un'elaborazione equivalente.

Esperimento radiomarcato VAL-1221

VAL-1221 e rhGAA sono stati coniugati con la desferoxamina chelante (DFO) da Isotherapeutics Group, LLC (Angleton, TX, USA). ⁸⁹Zr in acido ossalico 1 M è stato neutralizzato con carbonato di sodio 2 M. 0,2-1 mg di articolo di prova coniugato con DFO, VAL-1221 o rhGAA, sono stati diluiti con PBS a ≤ 1 mg/mL. Un volume noto contenente 1 mCi di ⁸⁹Zr neutralizzato è stato quindi aggiunto al tubo della centrifuga e lasciato a temperatura ambiente per almeno 60 minuti a seconda della quantità di composto coniugato aggiunto. Dopo il tempo desiderato, un'aliquota è stata individuata su una piastra TLC di carta da filtro e funzionata in acido citrico da 10 mM. La piastra è stata quindi sviluppata e letta sullo scanner TLC per

determinare l'efficienza dell'etichettatura. La soluzione è stata quindi caricata su una colonna PD-10 condizionata con buffer PBS. Le frazioni (500 µL) di PBS sono state caricate sulla colonna e le frazioni di eluizione sono state contate. In una sintesi tipica, il 40-60% del prodotto etichettato è stato recuperato in due o tre frazioni di PBS. ⁸⁹Zr-VAL-1221 o ⁸⁹Zr-rhGAA sono stati somministrati mediante iniezione endovenosa della vena della coda (TVI) a topi CD1 IGS WT e topi sono stati eutanassizzati 120 ore dopo l'iniezione. Sono stati raccolti campioni di tessuto cerebrale, lung, spleen, liver, cuore e quadricipite. I campioni sono stati pesati, caricati in un contatore Perkin Elmer Wallac 3 Gamma e la radioattività di ⁸⁹Zr in ciascun campione è stata ottenuta nell'arco di 1 minuto. Uno standard di dose iniettata dell'1% è stato contato insieme ai campioni. La percentuale di dose iniettata per grammo è stata calcolata in base alla dose nota iniettata, agli standard dell'1% e ai pesi dei tessuti.

Esperimento endovenoso di topo (i.v.)

I topi LKO e WT C57BL/6 sono stati iniettati con **XXX quantità** di 1221 o PBS tramite i.v. 4 iniezioni sono state eseguite con 1 iniezione ogni 4 giorni per un programma di trattamento di 12 giorni e i topi sono stati eutanassizzati per lussazione cervicale e decapitazione il giorno 13. I cuori e i muscoli del quadricipite sono stati sezionati, rapidamente risciacquati in PBS e i cuori tagliati in due con metà di ciascun cuore fissato in formalina tamponata neutra al 10% (NBF) per 48 ore e conservati in etanolo al 70% e l'altra metà del flash cardiaco congelato in LN₂. Tutti i muscoli del quadricipite erano congelati in LN₂. I tessuti cardiaci fissi NBF sono stati colorati PAS (vedi "colorazione PAS e analisi HALO PAS" di seguito) e visualizzati con **XXX**. I tessuti congelati del cuore e del quadricipite sono stati polverizzati utilizzando una smerigliatrice criogenica SPEX SamplePrep. La quantificazione dei polisaccaridi è stata effettuata utilizzando il metodo Pflüger come descritto in precedenza (Brewer *et al*, 2019b; Tagliabracci *et al*, 2008). In breve, il tessuto polverizzato è stato risospeso e bollito per 2 ore in 10 vol. 30% KOH. Dopo il raffreddamento, i campioni sono stati miscelati con etanolo freddo a 2 vol 95% con 10 µl 20 mM LiCl e lasciati precipitare durante la notte a -20 ° C. Il campione è stato poi centrifugato per 10 minuti a 16.000 x g a 4°C e il pellet lavato in etanolo con LiCl e riprecipitato a -20°C per 2 ore. Questo processo è stato ripetuto due volte e il pellet finale è stato risospeso in acqua. I polisaccaridi risospesi sono stati digeriti durante la notte dall'amiloglucosidasi di *Aspergillus niger* (Sigma) e il glucosio è stato determinato utilizzando un kit D-glucosio (Fisher) utilizzando la lettura fluorescente.

Esperimenti di somministrazione intracerebroventricolare (i.c.v.) di topo

Le iniezioni intracerebroventricolari (i.c.v.) sono state eseguite dalla Northern Biomedical Research (NBR) (Spring Lake, MI). I topi LKO sono stati anestetizzati utilizzando 0,5-1 L / min di ossigeno con l'1-5% di isoflurano prima dell'intervento chirurgico di impianto di canula. La canula i.c.v. era attaccata a una pompa osmotica contenente VAL-1221 o PBS, la canula veniva inserita nel ventricolo laterale cerebrale e l'intero apparato era racchiuso sotto la pelle. VAL-1221 (0,03 mg/die) o PBS sono stati somministrati continuamente ai topi per 2 o 7 giorni con eutanassia by isoflurano/sedazione di ossigeno e perfusione del ventricolo cardiaco sinistro dello 0,001% di nitrito di sodio in soluzione salina eparinizzata nei giorni 3 e 8, rispettivamente. I cervelli sono stati raccolti immediatamente dopo l'eutanassia e sono stati tagliati in due negli emisferi destro e sinistro. L'emisfero destro è stato risciacquato in PBS e quindi fissato al 10% di NBF per 48 ore, seguito dalla conservazione in etanolo al 70%. L'emisfero sinistro è stato congelato in LN₂ e poi polverizzato utilizzando una smerigliatrice criogenica SPEX SamplePrep. Il tessuto fisso è stato utilizzato per la colorazione PAS (vedere "colorazione PAS e analisi HALO PAS" di seguito) e il

tessuto congelato polverizzato è stato utilizzato per la quantificazione VAL-1221, la quantificazione dei polisaccaridi e la metabolomica (vedere "Saggio di attività enzimatica immunocapture", "Quantificazione polisaccaride GCMS" e "Colorazione PAS e analisi PASHALO"diseguito).

Saggio di attività enzimatica immunocattura

Le piastre nere ad alto legame a 96 pozzetti Corning 3925 sono state preparate come descritto in precedenza (Austin *et al*, 2019) utilizzando un anticorpo proprietario anti-3E10 Fab (Enable Therapeutics). I pozzetti sono stati quindi bloccati con latte al 5% in soluzione salina tris-tamponata (TBS) e lavati con TBS prima di essere incubati per 1 ora con campioni di tessuto cerebrale polverizzato da topi LKO trattati con VAL-1221 o PBS ICV che sono stati risospesi in TBS o purificati VAL-1221 in TBS (per la curva standard). I pozzetti sono stati lavati di nuovo con TBS prima di essere eseguiti attraverso il test di attività GAA (vedi "TEST DI ATTIVITÀ VAL-1221" sopra). Utilizzando una curva standard di VAL-1221 purificato, è possibile determinare la concentrazione di VAL-1221 intatto nel campione di tessuto. Schema di questo test mostrato nella Figura supplementare 3.

Quantificazione dei polisaccaridi GCMS

Le quantità relative di polisaccaridi dal tessuto cerebrale dopo il trattamento ICV con VAL-1221 o PBS sono state determinate utilizzando una procedura GCMS modificata a quella descritta da Young *et al*. (Young *et al*, 2020). In breve, i polisaccaridi purificati sono stati idrolizzati in 200ul di 2N HCl per 2 ore a 95 ° C. Quindi, 200ul 100% metanolo con 20uM L-norvalina è stato aggiunto per l'estrazione del metabolita. I campioni sono stati filati a 15.000 giri / min per 10 minuti a 4 ° C. 300ul del surnatante è stato trasferito in un nuovo tubo ed essiccato utilizzando una centrifuga sottovuoto a 10⁻³ mBar. I campioni essiccati sono stati derivatizzati mediante l'aggiunta di 20 mg/ml di metossiamina cloridrato in piridina e incubazione per 1,5 ore a 30°C. Aggiunta sequenziale di N-metil-trimetilsil-trifluoroacetammide (MSTFA) seguita da un tempo di incubazione di 30 min a 37°C con miscelazione accurata tra l'aggiunta di solventi. La miscela è stata quindi trasferita in una fiala per cromatografia in vetro ambrato a forma di V.

Colorazione PAS e analisi HALO PAS

Colorazione del tessuto cardiaco... Combinazione Periodica Acid-Schiff's Stain (PAS)

La colorazione del tessuto cerebrale è stata eseguita su sezioni spesse 4 micron tagliate da tessuto fissato con paraffina in formalina. Le diapositive sono state deparaffinizzate e idratate gradualmente. La colorazione PAS è stata effettuata su sezioni da 4 mm, insieme a controlli positivi appropriati secondo protocolli standard (Sheehan & Hrapchak, 1980). Dopo la colorazione, le diapositive sono state scansionate e le immagini sono state preparate utilizzando il software di analisi delle immagini HALO (PerkinElmer). Utilizzando il software HALO, l'area PAS+ è stata quantificata sia nel cervello nel suo complesso che in specifiche regioni anatomiche.

Metabolomica con GCMS

Il cervello di topo polverizzato P è stato estratto per i metaboliti polari utilizzando 1 mL di metanolo ghiacciato al 50%. La frazione polare è stata trasferita in una fiala di vetro GCMS a forma di V ed essiccata utilizzando una centrifuga sottovuoto a 10⁻³ mBar. I campioni polari essiccati sono stati derivatizzati mediante l'aggiunta di 20 mg/ml di metossiamina cloridrato in piridina e incubazione per 1,5 ore a 30°C. Aggiunta sequenziale di N-metil-trimetilsil-trifluoroacetammide (MSTFA) seguita da un

tempo di incubazione di 30 min a 37°C con miscelazione accurata tra l'aggiunta di solventi. La miscela è stata quindi trasferita in una fiala per cromatografia in vetro ambrato a forma di V.

I campioni sono stati quindi eseguiti su una coppia di gascromatografia (GC) Agilent 7800B a un rivelatore di spettrometria di massa a singolo quadrapolo 5977B. I protocolli GCMS erano simili a quelli descritti in precedenza (Young *et al*,2020; Sun *et al*,2021), ad eccezione di un gradiente di temperatura modificato è stato utilizzato per GC: la temperatura iniziale era di 130 ° C, mantenuta per 4 minuti, aumentata a 6 ° C / min a 243 ° C, aumentata a 60 ° C / min a 280 ° C e mantenuta per 2 minuti. L'energia di ionizzazione elettronica (EI) è stata impostata a 70 eV. La scansione (m/z:50-800) e la modalità di scansione completa sono state utilizzate per l'analisi degli spettri di massa. Per l'analisi dei polisaccaridi, il modello di frammentazione del metabolita EI e il tempo di ritenzione sono stati determinati dallo standard ultrapuro acquistato da sigma. Lo ione (m/z) e il tempo di ritenzione (min) per il glucosio erano 160 o 319m/z; 17,4 minuti. Gli spettri di massa sono stati tradotti in abbondanza relativa di metaboliti utilizzando il software Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS) abbinato alla libreria di metabolomica FiehnLib (disponibile tramite Agilent) per il tempo di ritenzione e il modello di frammentazione corrispondenti con un punteggio di confidenza di > 80 (Fiehn *et al*,2000; Kind *et al*,2009; Fiehn, 2016). I valori sono stati prima normalizzati in L-norvalina all'interno del campione per tenere conto della perdita del campione, quindi normalizzati in timina derivata dal DNA per rappresentare il volume di input.

Distribuzione del glicano con MALDI-imaging

Il tessuto cerebrale incorporato di paraffina fissa Formalin dal cervello dei topi LKO trattati con ICV è stato preparato su vetrini compatibili con imaging con laser assistito da matrice (MALDI-IMS) come descritto in precedenza (Stanback *et al*, 2021). I vetrini sono stati riscaldati a 60 ° C per 1 ora e quindi raffreddati a temperatura ambiente prima di essere deparaffinati utilizzando lavaggi sequenziali in xilene, 100% etanolo, 95% etanolo, 70% etanolo e acqua. Dopo la deparaffinizzazione, i vetrini sono stati collocati in un mailer coplin in tampone citraconico anidride (Thermo, anidride citraconica e acqua V/V 1:2, pH 3) e l'intero mailer è stato posto in un piroscavo vegetale per 25 min. Il mailer è stato lasciato raffreddare prima che il tampone citraconico fosse scambiato con acqua usando più lavaggi d'acqua e lo scivolo fosse essiccato prima della digestione enzimatica. I vetrini essiccati sono stati spruzzati con PNGase F utilizzando un M5 TMSprayer (HTX Technologies LLC) e protocolli precedentemente stabiliti (Stanback *et al*,2021; Drake *et al*,2018; Powers *et al*,2014). Dopo l'applicazione di PNGase F, i vetrini sono stati collocati in una camera umidificata preriscaldata a 37°C per 2 ore e poi spruzzati con matrice diacido α -ciano-4-idrossicinnamico (CHCA) (21 mg di CHCA in 3 mL 50% acetonitrile/50% acqua e 12 μ L acido trifluoroacetico). Il rilevamento di N-glicani è stato effettuato utilizzando uno spettrometro di massa ad alta definizione Waters SynaptG2-Xs con mobilità ionica a onda mobile (Waters Corporation) utilizzando impostazioni stabilite (Stanback *et al*,2021; Sun *et al*,2021). Acquisizione dati, spettri sono stati caricati su High Definition Imaging (HDI) Software (Waters Corporation) per l'analisi della gamma di massa da 750 a 4000m / z.

Figure Legends

Figura 1: VAL-1221 degrada gli LB *in vitro*. A. Schema del VAL-1221 AEF che mostra il frammento hFab, costituito da due peptidi legati da ponti disolfuro, e l'enzima GAA, fuso al peptide del frammento a catena pesante hFab. B. Gel SDS-PAGE riducente e non riducente che mostra la purezza del costrutto

VAL-1221. Si vedono modelli di bande caratteristici per VAL-1221. La corsia non riducente mostra la banda VAL-1221 a grandezza naturale e bande deboli che indicano una produzione ineguale dei due peptidi precursori. La corsia riducente mostra l'ablazione della banda a grandezza naturale e mostra bande forti alle dimensioni dei peptidi precursori. C. test di attività *in vitro* di VAL-1221 utilizzando 4-MU-GP come substrato con incubazioni di 1, 3 e 7 giorni. D. Saggio di quantificazione del glucosio GCMS con VAL-1221 su LKO mouse brain homogenate. E. Saggio di quantificazione del glucosio GCMS con VAL-1221 su omologato cerebrale di topo MKO. F. Quantificazione HPAEC-PAD delle molecole rilasciate da LKO LB purificati digeriti con VAL-1221 in funzione del tempo. G. Microscopia ottica degli LB LKO purificati colorati di Lugol digeriti per 168 ore con PBS o VAL-1221. Dati presentati come media con barre di errore di deviazione standard (SD), * $p \leq 0.05$.

Figura 2: VAL-1221 penetra nelle cellule in coltura e si distribuisce ai tessuti clinicamente rilevanti quando viene somministrato per via sistemica. R. L'immunofluorescenza mostra che i mioblasti di topo C2C12 assorbono VAL-1221 nel citoplasma e nei lisosomi. Blu: DAPI, Verde: LAMP2, Rosso: VAL-1221. B. Biodistribuzione radiomarcata VAL-1221 nei polmoni, cuore, quadricipite (muscolo) e cervello nei topi WT dopo TVI rispetto alla rhGAA radiomarcata. Dati presentati come media con barre di errore SD, ** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.0001$.

Figura 3: VAL-1221 degrada lb nel tessuto cardiaco e quadricipite muscolare dei topi LKO dopo TVI. A. Schema del programma di iniezione per questo esperimento. B. Quantificazione biochimica dei polisaccaridi nel tessuto cardiaco in topi WT e LKO con trattamento PBS o VAL-1221 TVI. C. Quantificazione biochimica dei polisaccaridi nel tessuto quadricipite in topi WT e LKO con trattamento PBS o VAL-1221 TVI. D. Colorazione PAS rappresentativa del tessuto cardiaco del topo LKO dopo trattamento TVI con PBS o VAL-1221. Dati presentati come medi con barre di errore SD, *** $p \leq 0.001$.

Figura 4: Degradazione di LB nel cervello di topi LKO dopo trattamento con VAL-1221 ICV. A. Schema del programma di trattamento per questo esperimento. B. Quantificazione di VAL-1221 consegnato al cervello dopo il trattamento ICV determinato dal test di attività enzimatica immunocatrizzata. C. Quantificazione, mediante GCMS, della degradazione dei polisaccaridi nel cervello dei topi LKO dopo trattamento con PBS o VAL-1221 ICV. D. Quantificazione, utilizzando il software di analisi delle immagini HALO, dell'area PAS+ del cervello dei topi LKO dopo trattamento PBS o VAL-1221 ICV.

Figura 5: Colorazione PAS delle regioni cerebrali da topi LKO dopo trattamento PBS o VAL-1221 ICV. Immagini rappresentative di colorazione PAS della corteccia, del talamo, del cervelletto e del tronco cerebrale da topi LKO dopo trattamento ICV con PBS o VAL-1221 mostrate con ingrandimento 40X.

Figura 6: Correzione del metabolita a WT nel cervello di topo LKO dopo trattamento ICV con VAL-1221. PCA (A) e heatmap (B) dei profili metabolici dei cervelli di topo WT e LKO trattati tramite ICV con PBS o VAL-1221 determinati utilizzando un approccio GCMS.

Figura 7: Correzione dei profili di glicosilazione legata all'N a WT nel cervello di topo LKO dopo trattamento ICV con VAL-1221. Cervelletto: grafici sPLSDA (A) e PUNTEGGIO VIP (B) dei profili glicani legati all'N. Immagini rappresentative (C) delle due distribuzioni di glicani N-linked della superficie cellulare più modificate nei cervelli di topo WT, nei cervelli di topo LKO e nei cervelli di topo LKO ICV trattati con VAL-1221 o PBS. Ippocampo: grafici sPLSDA (D) e VIP score (E) dei profili glicani N-linked. Immagini rappresentative (F) delle due distribuzioni di glicano legate all'N della superficie cellulare più modificate nei cervelli di topo WT, nei cervelli di topo LKO e nei cervelli di topo LKO trattati con VAL-1221 o PBS. **Gli schemi degli specifici glicani analizzati in queste immagini seguono le convenzioni X.**

Figura supplementare 1: Cromatogrammi HPAEC-PAD di digestioni LB cerebrali di topo LKO con VAL-1221. Cromatogrammi che mostrano la quantificazione delle diverse molecole rilasciate dagli LB

cerebrali di topo LKO durante una digestione *in vitro* con VAL-1221. I cromatogrammi sono mostrati per tutti i punti temporali raccolti durante l'esperimento (0, 24, 48, 72 e 168 ore).

Figura supplementare 2: Biodistribuzione radiomarcata di VAL-1221 nel fegato e nella milza di topo WT rispetto alla rhGAA radiomarcata. Distribuzione di VAL-1221 radiomarcato o rhGAA radiomarcato nel fegato e nella milza nei topi WT dopo TVI. Dati presentati come media con barre di errore SD, ** p≤0.01.

Figura supplementare 3: Schema del saggio di attività enzimatica immunocattrizzata per VAL-1221.

VAL-1221 (rosso e verde) viene catturato dall'omogeneizzato tissutale con un anticorpo anti-Fab adsorbito (blu). Quindi l'abbondanza di VAL-1221 presente viene misurata utilizzando l'attività del segmento GAA di VAL-1221 contro 4-MU-GP

Figura supplementare 4: area PAS+ di diverse regioni cerebrali nei topi LKO dopo trattamento ICV con PBS o VAL-1221. Grafici che mostrano l'area PAS+ dalla corteccia, dal talamo, dal cervelletto e dal tronco cerebrale, dopo il trattamento ICV con PBS o VAL-1221. La quantificazione è stata effettuata utilizzando il software di analisi delle immagini HALO.

Figura supplementare 5: Correzione della glicosilazione della superficie cellulare in regioni cerebrali aggiuntive. Tronco cerebrale: grafici sPLSDA (A) e punteggio VIP (B) dei profili glicani N-linked. Immagini rappresentative (C) della distribuzione del glicano legato all'N della superficie cellulare più modificata nei cervelli di topo WT, nei cervelli di topo LKO e nei cervelli di topo LKO ICV trattati con VAL-1221 o PBS.

Talamo: grafici sPLSDA (D) e VIP score (E) dei profili glicani legati all'N. Immagini rappresentative (F) della distribuzione del glicano legato all'N della superficie cellulare più modificata nei cervelli di topo WT, nei cervelli di topo LKO e nei cervelli di topo LKO trattati con VAL-1221 o PBS. Corteccia: grafici sPLSDA (G) e punteggio VIP (H) dei profili glicani legati all'N. Immagini rappresentative (I) della distribuzione del glicano legata all'N della superficie cellulare più modificata nei cervelli di topo WT, nei cervelli di topo LKO e nei cervelli di topo LKO trattati con VAL-1221 o PBS. **Gli schemi degli specifici glicani analizzati in queste immagini seguono le convenzioni X.**

Tabella supplementare 1: Analisi del prodotto di ripartizione tramite HPAEC-PAD di LB purificati digeriti con VAL-1221								
		Glucosio	Maltosio	DP-3 ·	DP-4 ·	DP-5 ·	DP-6 ·	DP-7 ·
Acqua vuota	Superficie (nC*min)	n.d.	2.78	n.d.	n.d.	n.d.	0.93	0.51
	Importo (µg)	n.d.	0.108	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Buffer vuoto	Superficie (nC*min)	1.59	5.93	4.57	2.69	n.d.	0.87	0.51
	Importo (µg)	0.022	0.229	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
24 ore VAL-1221	Superficie (nC*min)	0.24	10.32	2.18	2.21	0.77	0.86	0.68
	Importo (µg)	0.003	0.399	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
48 ore VAL-1221	Superficie (nC*min)	35.50	9.48	n.d.	n.d.	n.d.	0.90	0.75
	Importo (µg)	0.495	0.367	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
72 ore VAL-1221	Superficie (nC*min)	47.58	9.45	n.d.	n.d.	n.d.	0.89	0.65
	Importo (µg)	0.663	0.366	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
168 ore VAL-1221	Superficie (nC*min)	64.44	9.61	n.d.	n.d.	n.d.	0.84	0.80
	Importo (µg)	0.898	0.372	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Riconoscimenti

Dana Napier e il Markey Cancer Center Biospecimen Procurement & Translational Pathology Shared Resource Facility (BPTP SRF) (colorazione PAS)

Dr. Henry VanBrocklin e il Centro UCSF per l'imaging molecolare e funzionale (esperimento di biodistribuzione)

Biswa Choudhury e Sulabha Argade e GlycoAnalytics (Università della California, San Diego, CA) (HPAEC-PAD)

UK Sanders-Brown Center on Aging (Scansione diapositive)

Jill Zeller e Northern Biomedical Research (Spring Lake, MI) (trattamento ICV e raccolta dei tessuti)

Persone Tufts (colorazione PAS del cuore)

Referenze

Ahonen S, Nitschke S, Grossman TR, Kordasiewicz H, Wang P, Zhao X, Guisso DR, Kasiri S, Nitschke F, Minassian BA, *et al* (2021) La terapia antisenso Gys1 salva le basi neuropatologiche della malattia murina di Lafora Running head: terapia AsO Gys1 per la malattia di Lafora. *bioRxiv*

Augé E, Pelegrí C, Manich G, Cabezón I, Guinovart JJ, Duran J & Vilaplana J (2018) Astrociti e neuroni producono tipi distinti di corpi poliglucosani nella malattia di Lafora. *Glia* 66: 2094–2107

Austin GL, Simmons ZR, Klier JE, Rondon A, Hodges BL, Shaffer R, Aziz NM, McKnight TR, Pauly JR, Armstrong DD, *et al* (2019) Central Nervous System Delivery and Biodistribution Analysis of an Antibody-Enzyme Fusion for the Treatment of Lafora Disease. *Mol Pharm* 16: 3791–3801

Austin SL, Chiou A, Sun B, Case LE, Govendrageloo K, Hansen P & Kishnani PS (2017) Terapia sostitutiva enzimatica alfa alglucosidasi come approccio terapeutico per un paziente che presenta una mutazione PRKAG2. *Mol Genet Metab* 120: 96–100

Brewer MK, Grossman TR, McKnight TR, Goldberg YP, Landy H & Gentry MS (2019a) Il 4 ° Workshop internazionale sull'epilessia Lafora: cambiare paradigmi, percorsi di trattamento e speranza per i pazienti. *Epilessia Comportarsi* 90: 284–286

Brewer MK, Machio-Castello M, Viana R, Wayne JL, Kuchtová A, Simmons ZR, Sternbach S, Li S, Garcia-Gimeno MA, Serratosa J, *et al* (2021) Una pipeline empirica per la diagnosi personalizzata delle mutazioni della malattia di Lafora. *bioRxiv*

Brewer MK, Uittenbogaard A, Austin GL, Segvich DM, DePaoli-Roach A, Roach PJ, McCarthy JJ, Simmons ZR, Brandon JA, Zhou Z, *et al* (2019b) Targeting Pathogenic Lafora Bodies in Lafora Disease Using an Antibody-Enzyme Fusion. *Cell Metab* 30: 689–705

Chan EM, Young EJ, Ianzano L, Munteanu I, Zhao X, Christopoulos CC, Avanzini G, Elia M, Ackerley CA, Jovic NJ, *et al* (2003) Le mutazioni in NHLRC1 causano l'epilessia mioclonica progressiva. *Nat Genet* 35: 125–127

Chen PH, Cai L, Huffman K, Yang C, Kim J, Faubert B, Boroughs L, Ko B, Sudderth J, McMillan EA, *et al* (2019) Diversità metabolica nelle cellule tumorali polmonari umane non a piccole cellule. *Cella Mol* 76: 838-851.e5

Claudino WM, Quattrone A, Biganzoli L, Pestrin M, Bertini I & Di Leo A (2007) Metabolomica: risultati disponibili, progetti di ricerca attuali nel cancro al seno e applicazioni future. *J Clin Oncol* 25: 2840–2846

- Cohen-pfeffer JL, Gururangan S, Lester T, Lim DA, Shaywitz AJ, Westphal M & Slavic I (2017) Consegna intracerebroventricolare come via sicura a lungo termine di somministrazione dei farmaci. *Pediatr Neurol* 67: 23-35
- Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, Fantin VR, Jang HG, Jin S, Keenan MC, *et al* (2009) Le mutazioni IDH1 associate al cancro producono 2-idrossiglutarato. *Natura* 462: 739-744
- DePaoli-Roach AA, Tagliabracci VS, Segvich DM, Meyer CM, Irimia JM & Roach PJ (2010) L'esaurimento genetico della malin E3 ubiquitina ligasi nei topi porta a corpi lafora e all'accumulo di laforina insolubile. *J Biol Chem* 285: 25372-81
- Drake RR, Powers TW, Norris-Caneda K, Mehta AS & Angel PM (2018) In Situ Imaging of N-Glycans by MALDI Imaging Mass Spectrometry of Fresh or Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue. *Curr Protoc Protein Sci* 94: e68
- Duran J, Brewer MK, Hervera A, Gruart A, del Rio JA, Delgado-García JM & Guinovart JJ (2020) La mancanza di glicogeno astrocitico altera la plasticità sinaptica ma non la suscettibilità alle convulsioni. *Mol Neurobiol* 57: 4657-4666
- Duran J, Gruart A, Garcia-Rocha M, Delgado-Garcia JM & Guinovart JJ (2014) L'accumulo di glicogeno è alla base della neurodegenerazione e della compromissione dell'autofagia nella malattia di Lafora. *Hum Mol Genet* 23: 3147-3156
- Duran J, Hervera A, Markussen KH, Varea O, López-Soldado I, Sun RC, del Río JA, Gentry MS & Guinovart JJ (2021) L'accumulo di glicogeno astrocitico guida la fisiopatologia della neurodegenerazione nella malattia di Lafora. *Cervello*
- Duran J, Tevy MF, Garcia-Rocha M, Calbó J, Milán M & Guinovart JJ (2012) Effetti deleteri dell'accumulo neuronale di glicogeno in mosche e topi. *EMBO Mol Med* 4: 719-729
- Elgundi Z, Reslan M, Cruz E, Sifniotis V & Kayser V (2017) Lo stato dei giochi e il futuro delle terapie anticorpali. *Adv Drug Deliv Rev* 122: 2-19
- Ellingwood SS & Cheng A (2018) Aspetti biochimici e clinici delle malattie da accumulo di glicogeno. *J Endocrinol* 238: R131-R141 DOI:10.1530/JOE-18-0120 [PRESTAMPA]
- Fiehn O (2016) Metabolomica mediante gascromatografia-spettrometria di massa: profilazione combinata mirata e non mirata. *Curr Protoc Mol Biol* 2016: 30.4.1-30.4.32
- Fiehn O, Kopka J, Dörmann P, Altmann T, Trethewey RN & Willmitzer L (2000) Profilo dei metaboliti per la genomica funzionale delle piante. *Nat Biotechnol* 18: 1157-1161
- Finkel RS, Mercuri E, Darras BT, Connolly AM, Kuntz NL, Kirschner J, Chiriboga CA, Saito K, Servais L, Tizzano E, *et al* (2017) Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med* 377: 1723-1732
- Ganesh S, Delgado-Escueta AV, Sakamoto T, Avila MR, Machado-Salas J, Hoshii Y, Akagi T, Gomi H, Suzuki T, Amano K, *et al* (2002) L'interruzione mirata del gene Epm2a causa la formazione di corpi di inclusione Lafora, neurodegenerazione, atassia, epilessia mioclonica e compromissione della risposta comportamentale nei topi. *Hum Mol Genet* 11: 1251-62
- García-Cabrero AM, Marinas A, Guerrero R, De Córdoba SR, Serratosa JM & Sánchez MP (2012) Le

- delezioni di Laforin e malin nei topi producono disturbi neurologici simili. *J Neuropathol Exp Neurol* 71: 413–421
- Gentry MS, Afawi Z, Armstrong DD, Delgado-Escueta A, Goldberg YP, Grossman TR, Guinovart JJ, Harris F, Hurley TD, Michelucci R, *et al* (2020) The 5th International Lafora Epilepsy Workshop: Scienza di base che chiarisce le opzioni terapeutiche e si prepara per le terapie in clinica. In *Epilessia e comportamento* p 106839. Academic Press Inc.
- Gentry MS, Guinovart JJ, Minassian BA, Roach PJ & Serratosa JM (2018) La malattia di Lafora offre una finestra unica sul metabolismo del glicogeno neuronale. *J Biol Chem* 293: 7117–7125
- Gentry MS, Worby CA & Dixon JE (2005) Approfondimenti sulla malattia di Lafora: malin è una ubiquitina ligasi E3 che ubiquitina e promuove la degradazione della laforina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 8501–6
- Gumusgoz E, Guisso DR, Kasiri S, Wu J, Dear M, Verhalen B, Nitschke S, Mitra S, Nitschke F & Minassian BA (2021) Targeting Gys1 con AAV-SaCas9 Diminuisce i corpi poliglucosani patogeni e la neuroinfiammazione nei modelli murini adulti di polyglucosan body e malattia di Lafora. *Neuroterapia*
- Hansen JE, Fischer LK, Chan G, Chang SS, Baldwin SW, Aragon RJ, Carter JJ, Lilly M, Nishimura RN, Weisbart RH, *et al* (2007a) La terapia proteica p53 mediata da anticorpi previene le metastasi epatiche in vivo. *Cancer Res* 67: 1769–1774
- Hansen JE, Sohn W, Kim C, Chang SS, Huang NC, Santos DG, Chan G, Weisbart RH & Nishimura RN (2006) Terapia proteica Hsp70 mediata da anticorpi. *Brain Res* 1088: 187–196
- Hansen JE, Tse CM, Chan G, Heinze ER, Nishimura RN & Weisbart RH (2007b) Trasduzione della proteina intranucleare attraverso una via di salvataggio nucleosidica. *J Biol Chem* 282: 20790–20793
- Hansen JE, Weisbart RH & Nishimura RN (2005) Trasduzione mediata da anticorpi di proteine terapeutiche in cellule viventi. *Sci World J* 5: 782–788
- Heinze E, Baldwin S, Chan G, Hanson J, Song J, Clements D, Aragon R, Nishimura R, Reeves M & Weisbart R (2009) La terapia proteica FOXP3 mediata da anticorpi induce l'apoptosi nelle cellule tumorali in vitro e inibisce le metastasi in vivo. *Int J Oncol* 35: 167–173
- Jäger V, Büssow K, Wagner A, Weber S, Hust M, Frenzel A & Schirrmann T (2013) Produzione transitoria ad alto livello di anticorpi ricombinanti e proteine di fusione degli anticorpi nelle cellule HEK293. *BMC Biotechnol* 13: 1–20
- Kemper AR, Ream MA & Lam KK (2018) Revisione dell'implementazione dello screening neonatale per l'atrofia muscolare spinale Rapporto finale
- Khanna R, Flanagan JJ, Feng J, Soska R, Frascella M, Pellegrino LJ, Lun Y, Guillen D, Lockhart DJ & Valenzano KJ (2012) Lo chaperone farmacologico AT2220 aumenta l'assorbimento di acido umano ricombinante α -glucosidasi e la riduzione del glicogeno in un modello murino di malattia di Pompe. *PLoS One* 7: E40776
- Kind T, Tolstikov V, Fiehn O & Weiss RH (2007) Un approccio metabolomico urinario completo per identificare il cancro del rene. *Biochimica anale* 363: 185–195
- Kind T, Wohlgemuth G, Lee DY, Lu Y, Palazoglu M, Shahbaz S & Fiehn O (2009) FiehnLib: Librerie di indici

- spettrali e di ritenzione di massa per metabolomica basate su gascromatografia/spettrometria di massa a quadrupolo e tempo di volo. *Chem anale* 81: 10038–10048
- Kishnani P, Lachmann R, Mozaffar T, Walters C, Case L, Appleby M, Libri V, Kak M, Wencel M & Landy H (2019) Sicurezza ed efficacia di VAL-1221, una nuova proteina di fusione mirata al glicogeno citoplasmatico, in pazienti con malattia di Pompe ad insorgenza tardiva. *Mol Genet Metab* 126: S85–S86
- Kumar NN, Pizzo ME, Nehra G, Wilken-Resman B, Boroumand S & Thorne RG (2018) Immunoterapie passive per i disturbi del sistema nervoso centrale: sfide attuali di consegna e nuovi approcci. *Bioconjug Chem* 29: 3937–3966
- Lahuerta M, Gonzalez D, Aguado C, Fathinajafabadi A, Luis García-Giménez J, Moreno-Estellés M, Romá-Mateo C, Knecht E, Pallardó F V & Sanz P (2020) Neuroinfiammazione derivata da glia reattiva: un nuovo segno distintivo nell'epilessia mioclonica progressiva lafora che progredisce con l'età. *Mol Neurobiol* 57: 1607–1621
- Lawlor MW, Armstrong D, Viola MG, Widrick JJ, Meng H, Grange RW, Childers MK, Hsu CP, O'Callaghan M, Pierson CR, *et al* (2013) La terapia enzimatica sostitutiva salva la debolezza e migliora la patologia muscolare nei topi con miopotia miotubulare legata all'X. *Hum Mol Genet* 22: 1525–1538
- Lewis G, Morrill AM, Conway-Allen SL & Kim B (2020) Recensione di Cerliponase Alfa: terapia enzimatica sostitutiva umana ricombinante per la lipofusinosi ceroidi neuronale tardiva-infantile di tipo 2. *J Neurol bambino* 35: 348–353
- Liu X, Cooper DE, Cluntun AA, Warmoes MO, Zhao S, Reid MA, Liu J, Lund PJ, Lopes M, Garcia BA, *et al* (2018) Produzione di acetato dal glucosio e accoppiamento al metabolismo mitocondriale nei mammiferi. *Cell* 175: 502-513.e13
- Markussen KH, Andersen J V., Sun RC, Waagepetersen HS, Aldana BI & Gentry MS (2020) Malattia di Lafora: disturbi metabolici differenziali nei neuroni e negli astrociti. *FASEBJ* 34: 1–1
- Markussen KH, Macedo JKA, Machio M, Dolce A, Goldberg YP, Vander Kooi CW & Gentry MS (2021) The 6th International Lafora Epilepsy Workshop: Advances in the search for a cure - ClinicalKey. *Epilessia Behav* 119
- Mercuri E, Darras BT, Chiriboga CA, Day JW, Campbell C, Connolly AM, Iannaccone ST, Kirschner J, Kuntz NL, Saito K, *et al* (2018) Nusinersen versus Sham Control in Later-Onset Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med* 378: 625–635
- Minassian BA (2001) Malattia di Lafora: verso una sintesi clinica, patologica e molecolare. *Pediatr Neurol* 25: 21-9
- Minassian BA, Lee JR, Herbrick J-A, Huizenga J, Soder S, Mungall AJ, Dunham I, Gardner R, Fong CG, Carpenter S, *et al* (1998) Le mutazioni in un gene che codifica per una nuova proteina tirosina fosfatasi causano epilessia mioclonosica progressiva. *Natura* 20: 171–174
- Nitschke S, Chown EE, Zhao X, Gabrielian S, Petkovi S, Guisso DR, Perri AM, Wang P, Ahonen S, Nitschke F, *et al* (2021) Un knockout inducibile della glicogeno sintasi-1 si ferma ma non inverte la progressione della malattia di Lafora nei topi. *J Biol Chem* 296: 100150–100151
- Ojala KS, Reedich EJ, Didonato CJ & Meriney SD (2021) Alla ricerca di una cura: lo sviluppo di terapie per

alterare la progressione dell'atrofia muscolare spinale.

- Pederson BA, Turnbull J, Epp JR, Weaver SA, Zhao X, Pencea N, Roach PJ, Frankland PW, Ackerley CA & Minassian BA (2013) L'inibizione della sintesi del glicogeno previene la malattia di Lafora in un modello murino. *Ann Neurol* 74: 297
- Perlman RL (2016) Modelli murini di malattie umane: una prospettiva evolutiva. *Evol Med Public Heal* 2016: eow014
- van der Ploeg AT & Reuser AJJ (2008) Malattia di Pompe. *Lancet (Londra, Inghilterra)* 372: 1342–53
- Powers TW, Neely BA, Shao Y, Tang H, Troyer DA, Mehta AS, Haab BB & Drake RR (2014) MALDI imaging mass spectrometry profiling of N-glycans in formalin-fixed paraffin embedded clinical tissue blocks and tissue microarrays. *PLoS One* 9: E106255
- Rehman K, Hamid Akash MS, Akhtar B, Tariq M, Mahmood A & Ibrahim M (2016) Consegna di proteine terapeutiche: sfide e strategie. *Curr Drug Targets* 17: 1172-88
- Rubio-Villena C, Viana R, Bonet J, Garcia-Gimeno MA, Casado M, Heredia M & Sanz P (2018) Astrociti: nuovi attori nell'epilessia mioclonica progressiva di tipo Lafora. *Hum Mol Genet* 27: 1290–1300
- Sánchez-Elexpuru G, Serratos JM & Sánchez MP (2017) Il trattamento con seleniato di sodio migliora i sintomi e la suscettibilità alle convulsioni in un modello murino malinconico carente di malattia di Lafora. *Epilessia* 58: 467–475
- Sellers K, Fox MP, Li MB, Slone SP, Higashi RM, Miller DM, Wang Y, Yan J, Yuneva MO, Deshpande R, *et al* (2015) La piruvato carbossilasi è fondamentale per la proliferazione del cancro del polmone non a piccole cellule. *J Clin Invest* 125: 687–698
- Serratos JM (1999) Epilessie idiopatiche con una complessa modalità di ereditarietà. *Epilessia* 40: 12–16
- Serratos JM, Gómez-Garre P, Gallardo ME, Anta B, de Bernabé DB, Lindhout D, Augustijn PB, Tassinari CA, Malafosse RM, Topcu M, *et al* (1999) Un nuovo gene della tirosina fosfatasi è mutato nell'epilessia mioclonosica progressiva del tipo Lafora (EPM2). *Hum Mol Genet* 8: 345–52
- Shahwan A, Farrell M & Delanty N (2005) Epilessie miocloniche progressive: una rassegna degli aspetti genetici e terapeutici. *Lancet Neurol* 4: 239–248
- Sheehan DC & Hrapchak BB (1980) Teoria e pratica della tecnologia 2a ed. C. V. Mosby
- Slavc I, Cohen-Pfeffer JL, Gururangan S, Krauser J, Lim DA, Maldaun M, Schwering C, Shaywitz AJ & Westphal M (2018) Best practice per l'uso di dispositivi intracerebroventricolari per la somministrazione di farmaci. *Mol Genet Metab* 124: 184–188
- Stanback AE, Conroy LR, Young LEA, Hawkinson TR, Markussen KH, Clarke HA, Allison DB & Sun RC (2021) Analisi regionale di N-glicani e lipidi da tessuti utilizzando l'imaging con spettrometria di massa MALDI. *STAR Protoc* 2: 100304
- Sullivan MA, Nitschke S, Steup M, Minassian BA & Nitschke F (2017) Patogenesi della malattia di lafora: transizione del glicogeno solubile al poliglucosano insolubile. *Int J Mol Sci* 18
- Sun RC, Young LEA, Bruntz RC, Markussen KH, Zhou Z, Conroy LR, Hawkinson TR, Clarke HA, Stanback AE, Macedo JKA, *et al* (2021) Il glicogeno cerebrale funge da cache critica di glucosamina necessaria

per la glicosilazione delle proteine. *Cell Metab* 33: 1404-1417.e9

- Tagliabracci VS, Girard JM, Segvich D, Meyer C, Turnbull J, Zhao X, Minassian BA, Depaoli-Roach AA & Roach PJ (2008) Metabolismo anormale del glicogeno fosfato come causa della malattia di Lafora. *J Biol Chem* 283: 33816–25
- Tagliabracci VS, Turnbull J, Wang W, Girard J-M, Zhao X, Skurat A V, Delgado-Escueta A V, Minassian BA, Depaoli-Roach AA & Roach PJ (2007) Laforin è una glicogeno fosfatasi, la cui carenza porta ad un'elevata fosforilazione del glicogeno in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 19262–6
- Tang B, Frasinuk MS, Chikwana VM, Mahalingan KK, Morgan CA, Segvich DM, Bondarenko SP, Mrug GP, Wyrebek P, Watt DS, *et al* (2020) Scoperta e sviluppo di inibitori di piccole molecole della glicogeno sintasi. *J Med Chem* 63: 3538–3551
- Tasdogan A, Faubert B, Ramesh V, Ubellacker JM, Shen B, Solmonson A, Murphy MM, Gu Z, Gu W, Martin M, *et al* (2020) L'eterogeneità metabolica conferisce differenze nel potenziale metastatico del melanoma. *Natura* 577: 115–120
- Thomsen G, Burghes AHM, Hsieh C, Do J, Chu BTT, Perry S, Barkho B, Kaufmann P, Sproule DM, Feltner DE, *et al* (2021) Biodistribuzione di DNA, mRNA e proteina SMN onasemnogene abeparvovec nel tessuto umano. *Nat Med* 27: 1701–1711
- Turnbull J, DePaoli-Roach AA, Zhao X, Cortez MA, Pencea N, Tiberia E, Piliguan M, Roach PJ, Wang P, Ackerley CA, *et al* (2011) L'esaurimento del PTG rimuove i corpi di lafora e salva l'epilessia fatale della malattia lafora. *PLoS Genet* 7: 1–10
- Turnbull J, Epp JR, Goldsmith D, Zhao X, Pencea N, Wang P, Frankland PW, Ackerley CA & Minassian BA (2014) L'esaurimento delle proteine PTG salva la malattia di Lafora carente nel topo. *Ann Neurol* 75: 442–446
- Turnbull J, Tiberia E, Striano P, Genton P, Carpenter S, Ackerley CA & Minassian BA (2016) Malattia di Lafora. *Disord epilettico* 18: 38–62
- Valles-Ortega J, Duran J, Garcia-Rocha M, Bosch C, Saez I, Pujadas L, Serafin A, Cañas X, Soriano E, Delgado-García JM, *et al* (2011) Neurodegenerazione e menomazioni funzionali associate all'accumulo di glicogeno sintasi in un modello murino di malattia di Lafora. *EMBO Mol Med* 3: 667–81
- Vemana HP, Saraswat A, Bhutkar S, Patel K & Dukhande V V (2021) Una nuova terapia genica per la malattia neurodegenerativa di Lafora tramite lipoplex DLinDMA caricati con EPM2A. *Nanomedicina* 16: 1081-1095
- Villalba-Orero M, Sánchez-Elexpuru G, López-Olañeta M, Campuzano O, Bello-Arroyo E, García-Pavía P, Serratos JM, Brugada R, Sánchez MP & Lara-Pezzi E (2017) La malattia di Lafora è una cardiomiopatia metabolica ereditaria. *J Am Coll Cardiol* 69: 3007–3009
- Ward PS, Patel J, Wise DR, Abdel-Wahab O, Bennett BD, Collier HA, Cross JR, Fantin VR, Hedvat C V., Perl AE, *et al* (2010) La caratteristica comune delle mutazioni IDH1 e IDH2 associate alla leucemia è un'attività enzimatica neomorfica che converte α -chetoglutarato in 2-idrossiglutarato. *Cellula tumorale* 17: 225-234
- Weisbart RH, Hansen JE, Nishimura RN, Chan G, Wakelin R, Chang SS, Baresi L & Chamberlain JS (2005) Un veicolo di consegna intracellulare per la trasduzione proteica della micro-distrofina. *J Bersaglio*

farmacologico 13: 81–87

- Weisbart RH, Stempniak M, Harris S, Zack DJ & Ferreri K (1998) Un autoanticorpo viene modificato per l'uso come sistema di consegna per colpire il nucleo cellulare: implicazioni terapeutiche. *J Autoimmune* 11: 539–546
- Wick R & Byard RW (2006) Meccanismi di morte inaspettata e/o improvvisa nella malattia di Lafora. *Forensic Sci Int* 163: 144–147
- Worby CA, Gentry MS & Dixon JE (2006) Laforin, una fosfatasi a doppia specificità che defosforila i carboidrati complessi. *J Biol Chem* 281: 30412–8
- Yi H, Sun T, Armstrong D, Borneman S, Yang C, Austin S, Kishnani PS & Sun B (2017) Terapia enzimatica sostitutiva mediata da anticorpi mirata sia al glicogeno lisosomiale che citoplasmatico nella malattia di Pompe. *J Mol Med* 95: 513–521
- Young LEA, Brizze CO, Macedo JKA, Murphy RD, Contreras CJ, DePaoli-Roach AA, Roach PJ, Gentry MS & Sun RC (2020) Quantificazione accurata e sensibile di glucosio e fosfati di glucosio derivati da carboidrati di stoccaggio mediante spettrometria di massa. *Carbohydr Polym* 230: 115651
- Zack DJ, Stempniak M, Wong AL, Taylor C & Weisbart RH (1996) Meccanismi di penetrazione cellulare e localizzazione nucleare di un autoanticorpo del DNA anti-doppio filamento. *J Immunol* 157: 2082–2088
- Zhou Z, Austin GL, Shaffer R, Armstrong DD & Gentry MS (2019) Terapie enzimatiche mediate da anticorpi e applicazioni nelle malattie da accumulo di glicogeno. *Tendenze Mol Med*: 1–16
- Zuchero YJY, Chen X, Bien-Ly N, Bumbaca D, Tong RK, Gao X, Zhang S, Hoyte K, Luk W, Huntley MA, *et al* (2016) Scoperta di nuovi bersagli di barriera emato-encefalica per migliorare l'assorbimento cerebrale di anticorpi terapeutici. *Neurone* 89: 70–82