

Poster P.08.45

PROTEIN SUBSTITUTION THERAPY: A PROMISING TREATMENT FOR CDKL5 DEFICIENCY DISORDER

Medici G.*^[1], Trazzi S.^[1], De Franceschi M.^[1], Fuchs C.^[1], Loi M.^[1], Gennaccaro L.^[1], Galvani G.^[1], Tassinari M.^[1], Giustetto M.^[2], Kilstrup--Nielsen C.^[3], Pizzorusso T.^[4], Ciani E.^[1], Ren E.^[1]

^[1]1- Department of Biomedical and Neuromotor Sciences, University of Bologna ~ Bologna ~ Italy, ^[2]2- Department of Neuroscience, University of Turin ~ Turin ~ Italy, ^[3]3- Department of Biotechnology and Life Sciences, University of Insubria ~ Busto Arsizio ~ Italy, ^[4]4- Department of Neuroscience, Psychology, Drug Research and Child Health NEUROFARBA University of Florence ~ Florence ~ Italy

Cyclin-dependent kinase like-5 (CDKL5) deficiency disorder (CDD) is a rare and severe neurodevelopmental disease caused by mutations in the CDKL5 gene, located in the X-chromosome. The consequent unsuccessful CDKL5 protein expression in the nervous system leads to a severe phenotype characterized by intellectual disability, early-onset intractable epilepsy, motor impairment, and reduced visual acuity which, together with a complex corollary symptomatology, resembles Rett syndrome. Currently, there is no cure or effective treatment for CDD, and the mainstay of care for this disorder is support for the families. Therefore, identification of specific therapies will represent an important achievement in the field of public health.

In theory, for a monogenic disease such as CDD, delivery of a wild type copy of the CDKL5 protein to cells lacking functional CDKL5 represents a therapeutic approach worth considering. However, the failure of proteins to penetrate the cell membrane prevents their use as a therapeutic tool in monogenic disorders. Importantly, it has been reported that a protein transduction domain (TAT) is able to deliver macromolecules into cells and even into the brain when fused to a given protein. Based on these premises the aim of this study was to develop a TAT-CDKL5 protein substitution therapy for CDD in order to compensate for the lack of function of the CDKL5 protein.

We demonstrated that TAT-CDKL5 fusion protein is efficiently internalized by target cells and retains CDKL5 activity. When injected in vivo, TAT-CDKL5 fusion protein was able to cross the blood-brain barrier and diffuse into brain cells. Importantly, Cdkl5 KO mice treated with TAT-CDKL5 protein underwent a neurodevelopmental and behavioral improvement or even rescue. These promising results suggest that a protein substitution therapy with a TAT-CDKL5 fusion protein may be a successful therapy for CDD.

Terapia proteica sostitutiva: un trattamento promettente per il disordine CDKL5

Il disordine CDKL5 (Cyclin-dependent kinase like-5) è una rara e grave malattia del neurosviluppo causata da mutazioni nel gene CDKL5, localizzato sul cromosoma X. La conseguente mancata espressione della proteina CDKL5 nel sistema nervoso centrale porta allo sviluppo di un fenotipo clinico molto grave, caratterizzato da disabilità intellettiva, epilessia ad esordio precoce, problemi motori, e ridotta capacità visiva; sintomi principali di un quadro clinico che ricalca in parte quello della Sindrome di Rett. Al momento non esistono cure per il trattamento del disordine CDKL5 e l'unico sostegno possibile rimane il supporto alle famiglie. La scoperta di terapie efficaci rappresenta quindi un obiettivo fondamentale nel campo della salute pubblica.

Per una patologia monogenica quale il disordine CDKL5, fornire alle cellule malate una copia sana della proteina CDKL5 potrebbe rappresentare un valido approccio di cura. Tuttavia, la difficoltà delle proteine di superare la membrana cellulare ha impedito il loro uso come agenti terapeutici efficaci. A tal riguardo, è stato recentemente scoperto che un piccolo peptide di trasduzione (TAT) sarebbe capace di favorire l'entrata di macromolecole nelle cellule e persino nel cervello quando fuso alla

proteina di interesse. Considerando queste premesse, l'obiettivo dello studio è stato quello di sviluppare una terapia proteica sostitutiva basata sulla proteina di fusione TAT-CDKL5 e volta a compensare l'assenza della proteina nel disordine CDKL5.

Abbiamo dimostrato che la proteina di fusione TAT-CDKL5 è efficientemente internalizzata nelle cellule bersaglio e mantiene la sua attività biologica. Quando iniettata in vivo, la proteina di fusione è capace di attraversare la barriera ematoencefalica e diffondere nelle cellule nervose. Inoltre, il trattamento con TAT-CDKL5 in topi che mimano la patologia umana, i topi KO per CDKL5, porta ad un netto miglioramento del comportamento associato ad un miglioramento del neurosviluppo.

Questi promettenti risultati suggeriscono che una terapia proteica sostitutiva, con la proteina di fusione TAT-CDKL5, potrebbe rappresentare un efficace trattamento del disordine CDKL5.

Flinterman M, Farzaneh F, Habib N, Malik F, Gaken J, Tavassoli M (2009) Delivery of therapeutic proteins as secretable TAT fusion products. *Mol Ther* 17:334-342.

Kalscheuer VM, Tao J, Donnelly A, Hollway G, Schwinger E, Kubart S, Menzel C, Hoeltzenbein M, Tommerup N, Eyre H, Harbord M, Haan E, Sutherland GR, Ropers HH, Gecz J (2003) Disruption of the serine/threonine kinase 9 gene causes severe X-linked infantile spasms and mental retardation. *American journal of human genetics* 72:1401-1411.

Tao J, Van Esch H, Hagedorn-Greiwe M, Hoffmann K, Moser B, Raynaud M, Sperner J, Fryns JP, Schwinger E, Gecz J, Ropers HH, Kalscheuer VM (2004) Mutations in the X-linked cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5/STK9) gene are associated with severe neurodevelopmental retardation. *American journal of human genetics* 75:1149-1154.

Trazzi S, De Franceschi M, Fuchs C, Bastianini S, Viggiano R, Lupori L, Mazziotti R, Medici G, Lo Martire V, Ren E, Rimondini R, Zoccoli G, Bartesaghi R, Pizzorusso T, Ciani E (2018) CDKL5 protein substitution therapy rescues neurological phenotypes of a mouse model of CDKL5 disorder. *Hum Mol Genet* 27:1572-1592.

Weaving LS, Christodoulou J, Williamson SL, Friend KL, McKenzie OL, Archer H, Evans J, Clarke A, Pelka GJ, Tam PP, Watson C, Lahooti H, Ellaway CJ, Bennetts B, Leonard H, Gecz J (2004) Mutations of CDKL5 cause a severe neurodevelopmental disorder with infantile spasms and mental retardation. *American journal of human genetics* 75:1079-1093.

Disordine CDKL5

Coordinator: Elisabetta Ciani

Partners: Maurizio Giustetto, Charlotte Kilstrup-Nielsen, Tommaso Pizzorusso

Duration (N. Years): 3

Telethon Project (nr):

GGP15098

Disease Name:

CDKL5 Deficiency Disorder

Keywords:

CDKL5, Protein substitution therapy, monogenic