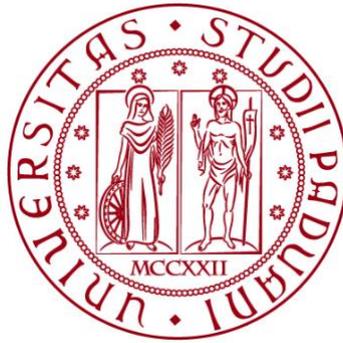


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



ELABORATO DI LAUREA

**NUOVO TRAGUARDO NELLA TERAPIA GENICA:
IL RUOLO DEL VETTORE VIRALE AAV8 NELLA
REGRESSIONE DELLA CARDIOMIOPATIA
ASSOCIATA ALL'ATASSIA DI FRIEDREICH,
PATOLOGIA NEURO-CARDIO-DEGENERATIVA**

Tutor: Prof.ssa Costantini Paola

Dipartimento di Biologia

Laureanda: Bettini Ilaria

ANNO ACCADEMICO 2024/2025

INDICE

1. ABSTRACT.....	4
2. STATO DELL'ARTE.....	5
2.1 Fratassina.....	5
2.2 AAV.....	6
2.2.1 AAV8.....	6
2.3 Introduzione al caso di studio: come la terapia genica tramite il vettore AAV8, reverte la cardiomiopatia e previene la mortalità precoce in un modello murino di atassia di Friedreich.....	7
3. MATERIALI E METODI.....	8
3.1 Vettori e costrutti virali.....	8
3.1.1 Costruzione e produzione del vettore AAV8 -PGK-FXN.....	8
3.2 AAV-hFXN analisi <i>in vitro</i>	9
3.2.1 Linee cellulari e condizioni di coltura.....	9
3.2.2 Immunofluorescenza quantitativa.....	9
3.2.3 Estrazione di RNA e analisi PCR Digital Droplet.....	9
3.2.4 Western blot.....	9
3.3 AAV-hFXN analisi <i>in vivo</i>	10
3.3.1 Animali modello in FRDA.....	10
3.3.2 Test su salute e sopravvivenza animale.....	10
3.3.3 Analisi cardiache.....	11
3.3.4 Analisi dei biomarcatori di lesione muscolare sieriche.....	11
3.3.5 Campionamento e raccolta di tessuti.....	11
3.3.6 Colorazioni ed esame istologico di tessuti.....	11
3.4 Trasduzione AAV e analisi dell'espressione di FXN.....	12
3.4.1 Analisi VCN.....	12
3.4.2 Analisi ELISA.....	12
3.4.3 Analisi western blot su cuore murino.....	12
3.5 Analisi statistiche.....	12
4. RISULTATI.....	13
4.1 Il trattamento AAV trasduce efficacemente linee cellulari murine e umane e porta ad una robusta espressione della fratassina matura.....	13
4.2 Il trattamento AAV prolunga la sopravvivenza e mantiene il peso corporeo.....	15
4.3 Il trattamento AAV corregge il fenomeno cardiaco.....	17
4.4 Il trattamento AAV risulta in un'espressione di FXN funzionale.....	19
4.5 Il trattamento AAV risulta in una distribuzione ampia di fratassina nel cuore.....	19
4.6 L'espressione di FXN non è stata associata a cardiotoxicità.....	21
5. DISCUSSIONE.....	21
6. BIBLIOGRAFIA.....	23
7. APPENDICE.....	24

1. ABSTRACT

L'atassia di Friedreich (FRDA) è una malattia rara, attualmente senza cura, multisistemica, autosomica e recessiva ed è anche la più comune delle atassie ad esordio precoce. Essa è causata dall'espansione, in omozigosi, della tripletta GAA, nel primo introne del gene *FXN*, che codifica per la proteina mitocondriale fratassina (FXN), la cui espressione risulta di conseguenza ridotta. FRDA è caratterizzata dalla progressiva neurodegenerazione, con molti pazienti che sviluppano inoltre cardiomiopia, la quale progredisce fino ad arresto cardiaco e morte; i primi sintomi a comparire sono la perdita di equilibrio e disordini della coordinazione, già a partire dall'infanzia o dall'adolescenza, procedendo con disturbi della crescita, debolezza muscolare, disartria, diabete mellito o resistenza insulinica, con un'aspettativa di vita, a partire dall'insorgenza dei primi sintomi, di circa 25 anni al massimo, nei casi più gravi.

Nel lavoro presentato in questo elaborato di tesi è stato esplorato il potenziale di invertire o prevenire la progressione del fenotipo cardiaco di FRDA in un modello murino della patologia, usando un vettore virale associato ad un adenovirus (AAV8), contenente la sequenza codificante il gene *FXN*. Il topo knockout condizionale $Fxn^{flox/null};MCK-Cre$, ovvero il topo FXN-MCK, contiene un'ablazione genica, che impedisce l'espressione della proteina nel muscolo cardiaco e scheletrico, portando all'insufficienza cardiaca, perdita di peso e morbidità, per la quale si intende un peggioramento dello stato di salute degli animali e/o un aumento della frequenza o gravità dei sintomi. I topi FXN-MCK hanno ricevuto un'iniezione intravenosa in singola dose, del vettore AAV8, ingegnerizzato con il gene *FXN* umano (hFXN) o murino (mFXN), sotto il controllo del promotore della fosfoglicerato chinasi. Facendo un confronto tra i topi di controllo FXN-MCK trattati solo con il veicolo, e i topi trattati con il vettore virale, questi ultimi mostrano un incremento del peso corporeo, inversione dei deficit cardiaci e aumento nella sopravvivenza, senza apparente tossicità nel cuore o nel fegato fino a 12 settimane post dose. L'espressione della proteina fratassina nel tessuto cardiaco è stata monitorata in maniera dose dipendente, dimostrando una distribuzione ampia in tutto il cuore, similmente al fenotipo wild type, ma più frammentaria. Questi risultati nel complesso supportano la possibilità di un approccio basato sul vettore AAV8 per il trattamento della cardiomiopia associata all'atassia di Friedreich.

2. STATO DELL'ARTE

2.1 Fratassina

La fratassina (FXN) è una proteina mitocondriale, coinvolta nella biosintesi dei centri Fe-S, cofattori chiave della catena respiratoria mitocondriale, la cui attività risulta quindi alterata nelle cellule di pazienti FRDA. Una delle conseguenze della compromissione delle funzioni mitocondriali nella malattia FRDA è lo squilibrio redox con un'alta produzione di specie reattive dell'ossigeno, con conseguente aumento dello stress ossidativo [1]. La diminuzione dei livelli di fratassina è associata all'alterazione della via Nrf2/Keap1; ciò produce una riduzione dei sistemi antiossidanti come, per esempio, la produzione di perossiredossine, glutarredossine, glutatione s-transferasi, SOD1 e SOD2, HO-1, GCL-M [2].

In tutti gli organismi esaminati finora, includendo diversi batteri e organismi eucarioti, la fratassina modula l'assemblaggio dei centri ferro-zolfo interagendo con il macchinario biosintetico responsabile della biogenesi di questi cofattori. Gli esperimenti finora svolti suggeriscono che la proteina non abbia un effetto diretto sul meccanismo chimico della biosintesi dei centri ferro-zolfo, anche se può esercitare un ruolo biologico essenziale. Nei diversi organismi cellulari in cui è presente, FXN è sempre associata ad altri componenti del macchinario di biosintesi dei centri ferro-zolfo (ISC); negli eucarioti è stato dimostrato che FXN agisce come un attivatore della sintesi di questi centri, promuovendo il trasferimento del gruppo persolfuro dalla cisteina desulfurasi PLP dipendente, alla proteina di *scaffold* ISCU2 su cui il centro viene assemblato.

La FXN umana è sintetizzata sottoforma di un precursore di 210 aminoacidi, che contiene una sequenza di transito verso il mitocondrio (MTS) all'N terminale, dove è poi tagliata e processata, fino a produrre la forma matura FXN 81-210.

È stato proposto che cambiamenti nella regione C terminale della proteina siano collegati alla sua stabilità conformazionale; dopo il ripiegamento della regione C terminale, lo stato nativo della proteina acquista una stabilità globale, rendendo la proteina stabile. Come sopraccitato, negli organismi dove la stabilità conformazionale della proteina è stata studiata, è stata trovata un'associazione tra la lunghezza della regione C terminale e la stabilità, con regioni al C terminale più lunghe [3]. Altre modifiche post traduzionali della proteina possono regolare la sua funzione e il metabolismo mitocondriale. L'omologa murina può essere acetilata a livello della lisina 189 (omologa della lisina 193 nell'uomo) e si è notato come questo tipo di modifica riduca la sintesi dei centri Fe-S; altra modifica post traduzionale che può essere svolta su questa proteina è la fosforilazione, la quale avviene principalmente sulla tirosina 118 e promuove l'ubiquitinazione della fratassina, che rappresenta un segnale per la sua degradazione. Inoltre, la modifica della tirosina 118 sembrerebbe alterare la stabilità della proteina stessa e si pensa anche che FXN possa essere ossidata sotto condizioni di stress ossidativo.

2.2 AAV

Nel corso della storia della terapia genica ci sono stati due incidenti principali riguardanti la sicurezza dei vettori virali e ciò ha portato Jim Wilson alla scoperta e produzione di un vettore più sicuro per la terapia genica, chiamato vettore AAV [4]. Questo vettore è solitamente utilizzato in cellule target differenziate come cellule del fegato, del sistema nervoso, dell'occhio, del muscolo-scheletrico. Il vantaggio di utilizzare questo vettore è che una volta inoculato, il DNA che trasporta può esistere in una forma libera all'interno del corpo del paziente per un periodo esteso, anche per tutta la vita e non porta all'inserzione di possibili mutazioni all'interno del genoma cellulare dell'ospite. Inoltre, esistono diversi sierotipi di AAV che hanno affinità specifiche per tessuti diversi.

AAV è un virus che presenta un DNA in singola elica con una struttura comprensiva di due parti: un capsido proteico icosaedrico di circa 26 nm in diametro e un genoma a DNA in singola elica di 4.7 kb di lunghezza. Nel capsido proteico sono contenuti tre tipi di proteine virali: VP 1, VP 2 e VP 3. Le due estremità del genoma di questo virus presentano due ITR a forma di T e tra queste due sequenze si trova la regione codificante le strutture virali, che contiene due geni, Rep e Cap. Il genoma contiene una cassetta, presentante il gene di interesse (GOI), affiancato da due ITR, un promotore a monte per iniziare l'espressione e una coda di PoliA a valle per aumentare la stabilità dell'mRNA e promuovere una traduzione efficiente.

La transfezione transiente basata su plasmide di cellule HEK293 in adesione (si tratta di linee cellulari indifferenziate embrionali di rene umano), coltivate in mezzi contenenti siero, rimane il metodo più comunemente utilizzato per produrre vettori AAV per ricerche precliniche. Sono stati sviluppati i metodi più nuovi che utilizzano sospensioni di cellule HEK293, coltivate anche in mezzi senza componenti animali e senza antibiotici mediante l'utilizzo di vari tipi di bioreattori come per esempio fiasche in agitazione, bioreattori agitati orbitalmente, bioreattori ad onde e bioreattori a serbatoio agitato. Linee cellulari stabilizzate derivanti dalle cellule HeLa, come per esempio linee impacchettate e produttrici, rappresentano un altro approccio per la produzione ad alto rendimento di particelle vettoriali, comparabile con quello di metodi di transfezione, ma limitando il rischio di contaminazione del DNA plasmidico e riducendo il costo del materiale di partenza di qualità GMP (Good Manufacturing Practice), intesa come l'insieme delle buone pratiche di fabbricazione, che assicurano la sicurezza e il controllo della qualità nel processo di produzione. Il successo generale della produzione clinica di AAV risiede in modo critico nella purificazione a valle per generare un prodotto clinico finale che abbia una resa alta, un alto potenziale e un alto livello di purezza e per ottenere ciò, si usa una cromatografia di affinità standard o un'ultracentrifugazione secondo gradiente di densità utilizzando iodixanolo o cloruro di cesio (CsCl). I processi di purificazione spesso concludono con uno step di scambio di concentrazione e/o buffer per la formulazione finale.

2.2.1 AAV8

La struttura della regione ordinata del monomero della proteina Vp del sierotipo AAV8 consiste di un core fatto da un barile β con otto catene e loop di superficie che determinano il tropismo del vettore; esso è stato isolato dal tessuto di scimmia rhesus e si riscontra un'omologia del 83% con AAV2.

AAV8 ha un ampio tropismo tissutale che include il cervello, il fegato, il cuore, la retina, i polmoni e le cellule muscolari; i sierotipi come AAV2, AAV5, AAV8 e

AAV9 sono più frequentemente utilizzati per trasdurre le cellule del fegato e diversi studi hanno dimostrato che AAV8 e AAV9 hanno entrambi una forte affinità per le cellule epatiche, con AAV8 che è il più epatofilo.

È stato dimostrato che l'iniezione di un vettore AAV8 con il gene *FVIII* in topi con attività FVIII compromessa è in grado di ripristinare l'attività FVIII nel plasma ed elimina i sintomi dell'emofilia A [5]. In un altro esperimento è stato utilizzato rAAV8 recante il gene *TRAIL* per indurre l'apoptosi nelle cellule HCT116 del cancro del colon, e le cellule del cancro del colon: le cellule del cancro del colon infettate dal virus ricombinante hanno mostrato una maggiore espressione di caspasi-3 e caspasi-8; ciò ha indicato che AAV8-TRAIL potrebbe attivare la via della caspasi e promuovere l'apoptosi nelle cellule tumorali del colon HCT116. AAV8 è stato utilizzato anche per trasdurre geni antitumorali come citochine e microRNA nel fegato umano. Questo sierotipo di AAV è stato utilizzato anche in HIV, lupus e diabete in modo promettente [6].

2.3 Introduzione al caso di studio: come la terapia genica tramite il vettore AAV8 reverte la cardiomiopatia e previene la mortalità precoce in un modello murino di atassia di Friedereich

L'atassia di Friedereich (FRDA) è una patologia autosomica recessiva causata dall'espansione della ripetizione trinucleotidica biallelica GAA nel primo introne del gene che codifica per fratassina (FXN). Questa mutazione intronica diminuisce l'espressione della proteina FXN, che nella maggior parte di pazienti varia tra il 2% e il 30% dei livelli normali. FXN è una proteina mitocondriale particolarmente conservata, la quale è coinvolta nell'assemblaggio dei complessi ferro-zolfo, una componente importante nella catena di trasporto degli elettroni in particolare nei complessi I, II e III. I livelli ridotti della proteina possono risultare in un accumulo di ferro nei mitocondri, con un conseguente danno ossidativo e diminuzione di produzione di ATP, e tutto ciò può portare infine alla morte cellulare nei tessuti vulnerabili, come per esempio nel sistema nervoso centrale e periferico, nel cuore e nel pancreas. Nonostante i deficit neurologici siano la caratteristica chiave della malattia, essa causa deficit multisistemici, che includono cardiomiopatia e intolleranza al glucosio [7]. Il suo esordio si verifica tipicamente durante la tarda infanzia fino all'adolescenza, con una progressione che a volte porta a morte prematura tra i 35 e i 45 anni di età. La patologia cardiaca nella FRDA inizialmente si manifesta come una cardiomiopatia concentrica e ipertrofica, la quale occasionalmente progredisce in una cardiomiopatia dilatata con il progredire del tempo; alcuni pazienti soffrono di ictus embolici e trombi murali nel ventricolo sinistro.

Cambiamenti istologici nel ventricolo sinistro tipicamente consistono in ipertrofia cellulare, fibrosi diffusa e necrosi focale del miocardio. La causa di morte più frequente riscontrata nella patologia è uno scompenso cardiaco o aritmia nel 59% dei casi [8].

Siccome questa atassia è una patologia di perdita di funzione monogenetica, un approccio terapeutico promettente potrebbe essere l'utilizzo di un vettore virale associato ad adenovirus per il trasferimento del gene wild type con un numero fisiologico di espansioni. In studi precedentemente pubblicati che utilizzavano questo tipo di terapia genica per trattare modelli murini che presentavano sintomatologia cardiaca o neurologica della patologia, sono stati riscontrati dei progressi terapeutici [9]. In termini di identificazione di livelli terapeutici minimi

di espressione FXN mediata da AAV, si nota che i topi eterozigoti FXN-knockout non possono essere distinti da quelli wild type. Allo stesso modo anche gli eterozigoti umani non presentano alcun sintomo clinico. Queste osservazioni suggeriscono che l'espressione dimezzata del livello endogeno di fratassina potrebbe risultare sufficiente per prevenire o fermare la progressione della patologia; inoltre, articoli recenti hanno dimostrato che la sovraespressione della proteina può causare tossicità sia in studi *in vitro* che *in vivo*. Nel caso di studio in esame è stato selezionato un promotore della fosfoglicerato chinasi con attività trascrizionale relativamente bassa. I vettori virali sono stati disegnati per contenere un DNA in singola elica con un gene umano o murino, costruito che poi è stato testato in un modello murino FRDA presentante sintomi cardiaci. Questi topi FXN-MCK mostravano una mancanza della proteina sia nel cuore che nel muscolo-scheletrico, una progressiva perdita di peso e un'aumentata morbidità a 10 settimane di vita circa; a seguito del trattamento con il costrutto, tutti i topi trattati sono sopravvissuti oltre le 10 settimane di età e hanno migliorato le funzioni cardiache e la morfologia con un'espressione della proteina aumentata e distribuita ampiamente in tutto il tessuto cardiaco, similmente ciò che si osserva nei modelli wild type.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Vettori e costrutti virali

Al fine di verificare la bontà della terapia genica basata su AAV nel revertire la cardiomiopatia associata alla patologia, sono stati progettati dei vettori AAV8 contenenti cDNA ottimizzati, ovvero co-cDNA, del gene *FXN*, sia nella forma umana che nell'omologo murino, la cui espressione è stata sottoposta al controllo trascrizionale del promotore umano 3-PGK, come precedentemente introdotto. I vettori ottenuti AAV8- hPGK-h*FXN*co e AAV8-hPGK-m*FXN*co, sono stati chiamati rispettivamente: AAV-h*FXN* e AAV-m*FXN*. Il costrutto genico è stato originariamente ottenuto da sub-clonaggio in un plasmide soggetto a brevetto e quindi di proprietà di un'azienda, includendo anche le ITR virali, necessarie per l'impacchettamento del genoma; successivamente, per facilitare il processamento dell'RNA, sono stati aggiunti un introne e il segnale di poliadenilazione, posto per l'inserimento della coda di poli-A a stabilizzare il costrutto, entrambi ricavati dal virus SV40.

3.1.1 Costruzione e produzione del vettore AAV8 -PGK-FXN

Tutto il genoma che si trova tra le inverted terminal repeats è genoma sintetico. Siccome questi costrutti vengono resi impossibilitati alla replicazione, in quanto mancano dei geni rep e cap, scelta mossa da ragioni di sicurezza, vengono poi transfettati in laboratorio insieme ad un plasmide helper del sierotipo 8, questa volta presentante i geni rep e cap. Le cellule che sono state transfettate appartengono alla linea Expi-293F (cellule umane derivate da HEK293); dopo 72 ore di incubazione, il vettore è stato purificato tramite l'utilizzo di diversi processi, tra cui una cromatografia liquida a scambio anionico ad alta performance. La soluzione di somministrazione (lattato Ringer con 0,01% di Pluronic, ovvero un tensioattivo di

stabilizzazione) aveva un titolo pari a $2,67 \times 10^{13}$ particelle genomiche/ mL per AAV-hFXN e $2,99 \times 10^{13}$ particelle genomiche/mL per AAV-mFXN.

3.2 AAV-hFXN analisi *in vitro*

3.2.1 Linee cellulari e condizioni di coltura

Per quanto riguarda le cellule utilizzate per i test preclinici *in vitro*, sono stati utilizzati due tipi di linee cellulari di origine e tropismo diverse: cellule C2C12, mioblasti murini, provenienti dalla American Type Culture Collection, e cellule AC16, cellule cardiache umane immortalizzate, provenienti da Sigma. Le prime sono state coltivate in terreno DMEM, con l'aggiunta del 10% di siero fetale bovino (FBS) inattivato e l'1% di antibiotico/ antimicotico, per prevenire contaminazioni di batteri o funghi; la seconda linea cellulare invece è stata coltivata in un terreno, sempre del tipo DMEM, ma questa volta F12, con l'aggiunta del 12,5% di FBS inattivato e l'1% di antibiotico/ antimicotico. Le condizioni di crescita sono state uguali, ovvero 37° con il 5% di CO₂.

3.2.2 Immunofluorescenza quantitativa

Per la semina sono state utilizzate piastre da 96 pozzetti e in ciascun pozzetto sono state seminate 15.000 cellule; dopo 24 ore il terreno è stato sostituito con uno nuovo fresco, presentante la MOI desiderata. Successivamente è stato aggiunto etoposide a concentrazione 3 mM e dopo 72 ore, a seguito di fissazione in formaldeide 4%, si è analizzata l'immunofluorescenza per visualizzare l'espressione di fratassina. È seguita l'incubazione con intercept blocking buffer e successivamente con l'anticorpo primario anti-FXN di coniglio a 2mg/mL per due ore e infine con l'anticorpo secondario contro il primario. Per la lettura delle piastre è stato utilizzato uno spettrofotometro SpectraMax M5 ad una lunghezza d'onda di 490/ 525 nm e poi la rappresentazione dei dati è stata fatta tramite GraphPad Prism. Le immagini sono state ottenute tramite l'impiego del microscopio Olympus IX73.

3.2.3 Estrazione di RNA e analisi PCR Digital Droplet

Il trattamento delle cellule tramite AAV-hFXN ed etoposide, è stato svolto seguendo lo stesso protocollo precedentemente descritto; a 72 ore le cellule sono state lisate in un tampone RLT e l'RNA è stato isolato con un kit RNeasy 96QIAcube HT. Si è continuato con la sintesi del cDNA con un altro kit: SuperScript IV VILO. A seguito della trascrizione, è avvenuta la quantificazione dell'mRNA tramite una PCR digitale a gocce (ddPCR) del sistema Bio-Rad, disegnando Primer e sonda TaqMan specifici per il riconoscimento di coFXN, essendo essa la sequenza introdotta nel costrutto virale ingegnerizzato.

3.2.4 Western blot

Per questo tipo di analisi sono state seminate 200.000 cellule C2C12/ pozzetto, in piastre da 6 pozzetti; dopo 24 ore il terreno è stato rimosso e sostituito con terreno contenente AAV-hFXN alla MOI di interesse. È poi seguita l'incubazione con etoposide, sempre alla concentrazione di 3mM. A 72 ore è avvenuta la lisi in un tampone, questa volta RIPA, il quale contiene degli inibitori di proteasi per evitare centrifugazione; il surnatante contenente le proteine solubili è stato raccolto ed è poi seguita la quantificazione proteica tramite BCA. Il campione è stato poi

preparato tramite l'aggiunta di un buffer contenente un detergente per la corsa elettroforetica (30 microgrammi di proteine per pozzetto su un gel in gradiente 4-12%, marcatore di peso molecolare e corsa della durata di 45 minuti a 180 V), alla quale è seguito il blotting su una membrana di PVDF, tramite lo strumento Trans - Blot Turbo di Bio-Rad. La membrana è stata bloccata per un'ora e incubata con un anticorpo primario anti-FXN, per rilevare la fratassina, un anticorpo primario anti-GAPDH, per il controllo del caricamento proteico, e successivamente si sono aggiunti gli anticorpi secondari fluorescenti anti-mouse IgG e anti-rabbit IgG, rispettivamente per la visualizzazione di FXN e GAPDH. Infine, dopo gli opportuni lavaggi, si è potuto visualizzare la membrana tramite l'impiego di LI-COR Odyssey.

3.3 AAV-hFXN analisi *in vivo*

3.3.1 Animali modello in FRDA

L'organismo modello utilizzato nello studio in esame è un topo FXN-MCK (B6.Cg-Fxn^{em2}Lutzy Fxn^{em2.1}Lutzy Tg (Ckmm-cre) 5 Khn/J; The Jackson Laboratory stock no. 029720), i quali presentano il gene *FXN* in doppia copia, una delle quali subisce un knockout globale dell'esone 2, tale per cui questa copia non funziona in nessun tipo di tessuto, mentre l'altra copia presenta, a fiancheggiare le estremità dello stesso esone, i siti loxP, tale per cui risulta funzionante in tutti i tessuti tranne nel muscolo scheletrico e cardiaco; ciò è possibile perché questi topi presentano anche un transgene codificante la Cre ricombinasi, sottoposta al controllo trascrizionale del promotore della creatin-chinasi muscolare (MCK); perciò nel muscolo cardiaco e scheletrico, dove verrà prodotto questo enzima, l'esone 2 fiancheggiato dai siti di taglio per esso, verrà rimosso e perciò non si riscontrerà espressione della proteina in questi due tessuti, ricreando quindi la condizione riscontrata nella patologia FRDA. Tra la sintomatologia riscontrata in questi modelli, come già citato diverse volte, è stato riscontrato un deficit delle funzioni cardiache, una perdita di peso progressiva e un aumento di morbidità riscontrati ciascuno a circa 10 settimane di vita e questa caratterizzazione è stata svolta da laboratori Jackson, i quali hanno riscontrato precisamente una diminuzione del battito cardiaco, della frazione di eiezione, un accorciamento frazionario del ventricolo sinistro e anche un aumento della massa del ventricolo sinistro, sinonimo dell'ipertrofia. Il trattamento e le cure rivolte a questo modello murino sono stati svolti in modo conforme alle normative etiche e di biosicurezza stipulate dai vari comitati e istituzioni, presso i laboratori Jackson; inoltre, gli animali sono stati allevati in condizioni di temperatura, umidità, ciclo di luce e buio controllati. Successivamente sono stati svolti esami clinici come analisi istologiche e anche analisi di parametri biochimici.

3.3.2 Test su salute e sopravvivenza animale

Presso i laboratori Jackson sono state prese tutte le massime precauzioni al fine di garantire una buona salute a questi topi, in particolare venivano fatti diversi test fisici come per esempio il monitoraggio del peso corporeo, che veniva fatto settimanalmente e giornalmente si verificava che fossero vivaci, responsivi e in salute; inoltre nel momento in cui essi raggiungevano gli endpoint umanitari, indicatori etici di sofferenza o compromissione significativa del benessere

dell'animale, indipendentemente dall'età, essi venivano sottoposti all'eutanasia, secondo criteri etici. Fra i criteri determinanti si riscontra la perdita maggiore rispetto al 20% del peso massimo corporeo, la mancata risposta a stimoli, ma anche tutta una serie di malformazioni che potessero compromettere l'assunzione di acqua e cibo da parte di questi animali. È stata infine prestata particolare attenzione al garantire una raccolta precisa e minuziosa del maggior numero possibile di tessuti destinati alle analisi istologiche.

3.3.3 Analisi cardiache

Le analisi cardiache sono state svolte sia prima della somministrazione del trattamento che prima dell'eutanasia, indotta a 9-10 settimane per la corte 1 e a 18-19 settimane per la corte 2, destinata alla stima della durata di vita. Al fine della ecocardiografia gli animali sono stati sedati con isoflurano fino al 5% di concentrazione e il test è stato effettuato presso il centro biometrics dei laboratori Jackson tramite un ecografo ad alta frequenza; grazie ad esso si sono ottenute delle immagini in vista parasternale (quindi posizionando l'ecografo a livello dello sterno, per avere una visualizzazione diretta del cuore) a sezione trasversale del ventricolo sinistro, necessarie al calcolo di volumi di sangue diastolico e sistolico, della frazione di eiezione, del frazionamento della contrazione, della portata cardiaca e del volume di gittata.

3.3.4 Analisi dei biomarcatori sierici di lesione muscolare

I biomarcatori presi in considerazione, sono stati analizzati a partire dal sangue grezzo, processato per ottenere il plasma. Tra di essi risultano: la troponina cardiaca I (cTnl), la troponina scheletrica, la proteina legante gli acidi grassi e la catena leggera della miosina; essi sono stati tutti valutati attraverso l'impiego di un kit commerciale di MesoScale Discovery, mentre la creatin chinasi è stata misurata direttamente dal Dipartimento chimico dei laboratori Jackson. Tra i marcatori, il primo citato è il più specifico e sensibile per visualizzare il danno cardiaco, mentre le proteine leganti gli acidi grassi spesso vengono rilasciate più rapidamente nel sangue rispetto alla troponina; quindi, risulta necessario per una diagnosi precoce del danno, mentre la creatin chinasi è un marcatore tradizionale per la lesione cardiaca.

3.3.5 Campionamento e raccolta di tessuti

All'interno della coorte 1, sono stati ricavati due gruppi, dei quali il primo è stato destinato ad analisi biochimiche, raccogliendo cuore, cervelletto, DRG e midollo spinale per analizzare e quantificare l'espressione della proteina e delle copie di vettore, mentre il secondo gruppo è stato utilizzato per analisi istologiche, raccogliendo e fissando campioni di cuore, fegato, nervo sciatico, muscolo quadricipite, midollo spinale, diaframma, DRG e cervello. Per quanto riguarda invece la coorte 2, sono state svolte analisi biochimiche utilizzando i tessuti cardiaci e analisi istologiche utilizzando gli altri tessuti prelevati.

3.3.6 Colorazioni ed esame istologico di tessuti

Fra le colorazioni utilizzate troviamo l'ematossilina ed eosina, per una valutazione generale, svolta da un patologo veterinario sul fenotipo cardiaco, un'analisi di immunohistochimica, mediante un anticorpo anti-FXN, per valutare la distribuzione

della proteina, la colorazione di Masson per riscontrare la fibrosi e la colorazione di Perls per verificare l'accumulo di ferro nei miociti.

3.4 Trasduzione AAV e analisi dell'espressione di FXN

3.4.1 analisi VCN (analisi del numero di copie del vettore)

Al fine di quantificare la distribuzione del vettore, si è utilizzata una qPCR, impiegando come standard di quantificazione un DNA plasmidico lineare, contenente il vettore AAVAud2-PGK-FXN e delle sonde specifiche per la rilevazione di ampliconi coDNA. Tramite questo metodo si può quantificare in tempo reale anche piccole quantità di DNA e per la normalizzazione si è utilizzato un gene di riferimento che è sempre presente nel DNA del topo, ovvero PCBP2.

3.4.2 Analisi ELISA

Per la quantificazione e l'analisi delle proteine espresse mFXN e hFXN, nel cuore, cervelletto, DRG, midollo spinale e fegato, si è utilizzato un kit ELISA. Tramite questo kit i dati sono espressi in ng/mg di FXN riscontrata nel tessuto in esame. Tramite poi western blot, si è potuto anche stimare la dimensione apparente delle due proteine omologhe, in quanto esso sfrutta un'elettroforesi su gel (SDS-PAGE) per separare le proteine in base al loro peso molecolare.

3.4.3 Analisi di western blot su cuore murino

Sono stati utilizzati degli anticorpi primari e degli anticorpi secondari per monitorare i livelli di espressione delle due isoforme proteiche; i primari erano specifici per: mFXN (Abcam), hFXN (Invitrogen) e GAPDH (Abcam), mentre gli anticorpi secondari erano marcati con fluorofori IRDye o HRP, affinché potesse essere monitorato e rilevato il segnale tramite uno scanner di fluorescenza, il LICOR Odyssey. In particolare, gli anticorpi anti-GAPDH, sono stati impiegati come controllo di caricamento perché GAPDH risulta espressa stabilmente in quasi tutte le cellule di diversi tessuti e perciò viene utilizzata come controllo di caricamento delle proteine.

3.5 Analisi statistiche

Per quanto riguarda le analisi statistiche, si è utilizzato il test del chi quadrato e del log-rank di Mantel Cox, per confrontare la sopravvivenza tra i gruppi trattati e i controlli wild type, monitorati alla stessa settimana di vita, mentre è stato utilizzato il test t student per analizzare statisticamente il peso corporeo medio per sesso e gruppo di trattamento \pm deviazione standard; infine i dati ricavati dalla funzione cardiaca, dei marcatori cardiaci e dal peso del cuore normalizzato per il peso corporeo, sono stati analizzati statisticamente tramite ANOVA.

4. RISULTATI

4.1 Il trattamento AAV trasduce efficacemente linee cellulari murine e umane e porta ad una robusta espressione della fratassina matura

Nel caso di studio in esame il tentativo è stato quello di inserire il vettore AAV-hFXN all'interno di linee cellulari C2C12, le quali sono mioblasti di topo immortalizzati, ovvero modificate affinché riescano a proliferare indefinitivamente. Le analisi sono state fatte mediante immunofluorescenza e da essa si è notata un'espressione della proteina fratassina con andamento dose dipendente (**Figura 1**).

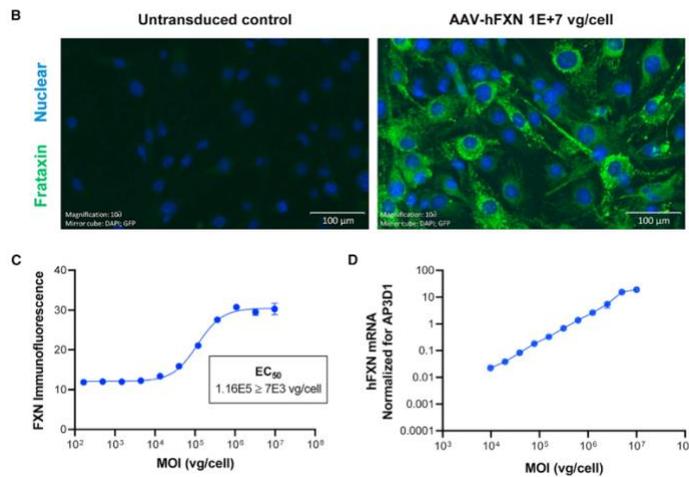


Figura 1. Immunofluorescenza rappresentativa e analisi dell'andamento dose dipendente dell'espressione di fratassina

(B) immagine rappresentativa di immunofluorescenza (IF) di cellule C2C12 trattate con 1E+7 vg/cell di AAV-hFXN o controllo negativo non trasdotto. FXN (verde) e nucleo (blu). Le barre di scala rappresentano 100 μ m. (C) curva dose-risposta dell'intensità di immunofluorescenza di fratassina in funzione della MOI (vg/cell) di AAV-hFXN, adattata con equazione a 4PL per determinare il valore di EC₅₀. (D) grafico Log-log nell'espressione di mRNA di fratassina indotta da AAV-hFXN in funzione della MOI (vg/cell) di AAV-hFXN. I grafici sono stati realizzati con GraphPad Prism. Le immagini di immunofluorescenza (IF) sono state acquisite con il microscopio a fluorescenza Odyssey IX73. IF = immunofluorescenza; MOI = multiplicity of infection.

Si può notare come la metà della massima risposta, cioè la metà della quantità massima di proteina prodotta, si ottiene quando ogni cellula riceve circa 116.000 particelle virali, per poi raggiungere un asintoto, all'incirca a 1 milione di particelle virali per cellula; anche l'mRNA ha un andamento dose dipendente ma senza l'andamento asintotico della curva di fluorescenza (**Figura 2**). Per verificare che la proteina prodotta fosse stabile e effettivamente matura sono state fatte analisi tramite Western blot e queste hanno confermato le ipotesi, ovvero hanno dimostrato la forma matura della proteina e la sua espressione su base dose dipendente, riuscendo a individuare, tutte le forme intermedie che portano alla forma matura (**Figura 2**).

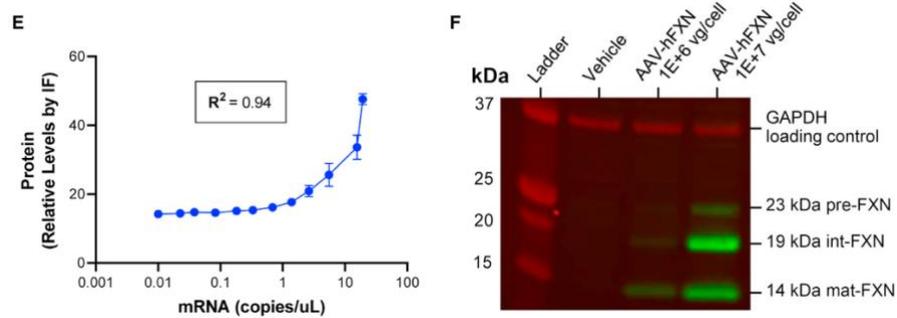


Figura 2. Correlazione tra l'espressione di mRNA e proteina FXN e analisi tramite Western blot
 (E) grafico di correlazione tra i livelli di espressione di mRNA e proteina FXN nelle cellule dopo trasduzione con AAV-hFXN. (F) Western blot per la proteina FXN (verde) con controllo di carico GAPDH (rosso), acquisito con il sistema LI-COR Odyssey. Le immagini di immunofluorescenza (IF) sono state acquisite con il microscopio a fluorescenza Odyssey IX73. IF = immunofluorescenza; MOI = multiplicity of infection.

Successivamente, volendo verificare che la terapia funzionasse anche in cellule umane, lo stesso esperimento è stato ripetuto su cellule AC16, cardiomiociti umani immortalizzati, che sono stati infettati con diverse quantità di particelle virali (a partire da 100.000 fino a 1 miliardo di particelle virali per cellula); è stata osservata la localizzazione della proteina nel citoplasma e che la sua espressione risulta effettivamente dose dipendente, come riscontrato nelle cellule murine (**Figura 3**).

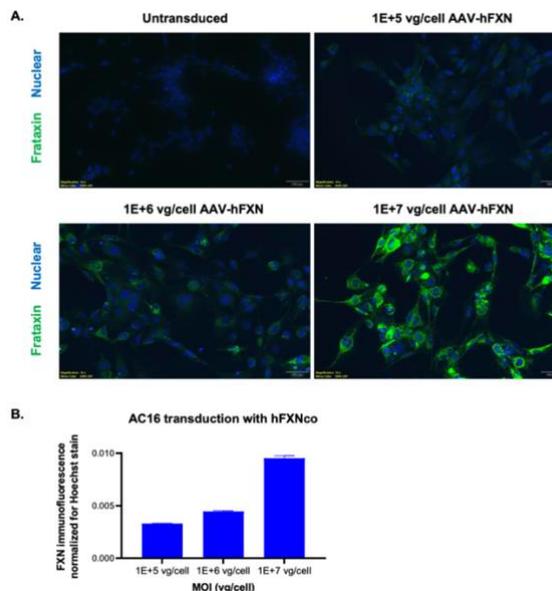


Figura 3. Test *in vitro* del costrutto AAV. Immagini rappresentative di cellule AC16 trasdotte con 1E+5, 1E+6, o 1E+7 vg/cell di AAV-hFXN e un controllo negativo non trasdotto; barre di scala= 100 μ m (A). La quantificazione dell'immunofluorescenza della frataxina è stata rappresentata graficamente per ciascun MOI tramite GraphPad Prism (B). Le immagini di immunofluorescenza sono state ottenute con un microscopio a fluorescenza Olympus IX73, modello Odyssey.

4.2 Il trattamento AAV prolunga la sopravvivenza e mantiene il peso corporeo

Per testare l'efficienza di recupero da parte dei vettori AAV-hFXN and AAV-mFXN verso la cardiomiopatia della patologia, è stato scelto come animale modello un topo FXN-MCK, nel quale era stato indotto il knockout del gene *FXN*, specificamente nel tessuto muscolare cardiaco e scheletrico. Questo modello è stato scelto in quanto presenta deficit cardiaci funzionali, come la riduzione della frazione di eiezione, i quali sono solitamente associati a perdita di peso e aumento di morbilità. Inizialmente sono stati trattati dei topi FXN-MCK solo con veicolo e questi sono andati incontro a morte prima delle 10 settimane di vita. Successivamente sono stati trattati dei topi FXN-MCK a 6 settimane di vita con il costrutto virale AAV-hFXN o AAV-mFXN, con dosi $3E+13$ vg/kg o $1E+14$ vg/kg, e questi (coorte 1), straordinariamente rispetto all'atteso, sono sopravvissuti fino alla necropsia fissata a 10 settimane di età, quindi per quattro settimane post-dose, esattamente come per i topi di controllo wild type trattati solo con il veicolo. La coorte 2, ossia un gruppo trattato con un dosaggio minore di terapia, pari a $3E+13$ vg/kg, ha invece raggiunto un secondo punto di controllo fissato a 18 WOA; dopo questo secondo punto di controllo, passate 12 settimane dopo la somministrazione della dose, i topi di questa coorte sono stati sottoposti a eutanasia nonostante i loro valori corporei fossero ancora nella norma (**Tabella 1**). La **Figura 4** riporta lo schema e i risultati dell'esperimento in termini di sopravvivenza.

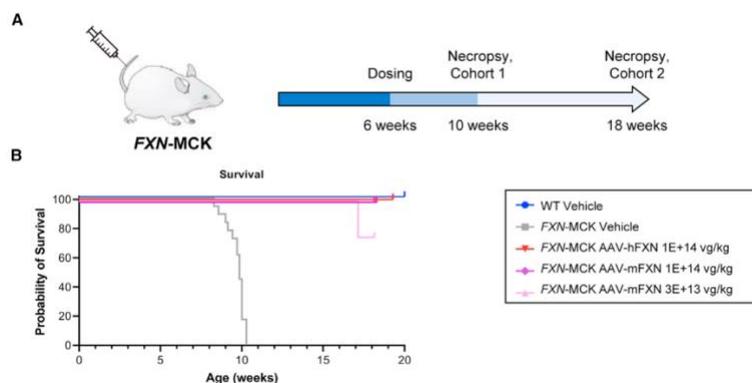


Figura 4. Studio di sopravvivenza e disegno dell'esperimento in vivo nei topi FXN-MCK.

(A) disegno dello studio proof of concept in vivo sui topi: i topi FXN-MCK sono stati trattati per via endovenosa a 6 settimane di età. I topi della coorte 1 sono stati sottoposti ad eutanasia a 10 settimane di età. I topi della coorte 2 sono stati monitorati oltre le 10 settimane fino a quando un animale della coorte ha raggiunto il punto di intervento umano (punto di eutanasia umanitaria) e l'intera coorte è stata sottoposta ad eutanasia, cosa avvenuta a 18 settimane di età. (B) la probabilità di sopravvivenza risultata significativamente inferiore nei topi FXN-MCK trattati con veicolo rispetto ai topi FXN-MCK trattati con AAV e ai topi di controllo WT. I dati sono rappresentati come l'età alla quale topi sono stati sottoposti ad eutanasia in caso di condizioni critiche, come descritto nella sezione materiali e metodi.

Group	N (gender)	Genotype	Treatment	Dose Level (vg/kg)	*Cohort-Analysis	Duration
1	2F/2M	WT	Vehicle	NA	1st - Histology	4 weeks
2	2F/2M	WT	Vehicle	NA	1st - Bioanalytical	4 weeks
3	2F/2M	WT	Vehicle	NA	2nd - Bioanalytical	12 weeks
4	3F/3M	<i>FXN-MCK</i>	Vehicle	NA	1st - Histology	**4 weeks
5	3F/3M	<i>FXN-MCK</i>	Vehicle	NA	1st - Bioanalytical	**4 weeks
6	3F/3M	<i>FXN-MCK</i>	Vehicle	NA	2nd - Bioanalytical	**12 weeks
7	3F/3M	<i>FXN-MCK</i>	AAV-hFXN	1E+14	1st - Histology	4 weeks
8	3F/3M	<i>FXN-MCK</i>	AAV-hFXN	1E+14	1st - Bioanalytical	4 weeks
9	3F/3M	<i>FXN-MCK</i>	AAV-hFXN	1E+14	2nd - Bioanalytical	12 weeks
10	3F/3M	<i>FXN-MCK</i>	AAV-mFXN	1E+14	1st - Histology	4 weeks
11	3F/3M	<i>FXN-MCK</i>	AAV-mFXN	1E+14	1st - Bioanalytical	4 weeks
12	3F/3M	<i>FXN-MCK</i>	AAV-mFXN	1E+14	2nd - Bioanalytical	12 weeks
13	3F/2M [#]	<i>FXN-MCK</i>	AAV-mFXN	3E+13	1st - Histology	4 weeks
14	2F/3M [#]	<i>FXN-MCK</i>	AAV-mFXN	3E+13	1st - Bioanalytical	4 weeks
15	2F/2M [#]	<i>FXN-MCK</i>	AAV-mFXN	3E+13	2nd - Bioanalytical	12 weeks

[#] Animal numbers depended on the availability.

* Animals in Cohort 2 were monitored beyond 10 WOA; these animals were euthanized once one animal in the cohort reached humane endpoint and the entire cohort (group 3, 9, 12, and 15) was euthanized for tissue collection. This happened at 18 WOA, therefore, 12 weeks post dose for the lifespan groups.

** Groups 4-6: untreated *FXN-MCK* mice have a mean survival of 10+/-1 WOA.

F, female; M, male; NA, not applicable; WOA, weeks of age; WT, wild-type.

Tabella 1. Disegno sperimentale dello studio sulla terapia genica con AAV8-FXN nel modello murino *FXN-MCK*. È stato somministrato AAV8-hPGK-hFXNco (AAV hFXN) o AAV8-hPGK-mFXNco (AAV-mFXN) in una singola dose intravenosa, con dosaggio: 3E+13 vg/kg o 1E+14 vg/kg, in topi *FXN-MCK* o in topi wild type come controllo (Laboratori Jackson: 000664). Sono state considerate due coorti nello studio. Nella prima coorte gli animali sono stati inoculati a 6 settimane di età e sacrificati a 10 settimane d'età per fornire il primo punto di controllo post dose dopo quattro settimane dalla somministrazione. I modelli della seconda coorte invece sono stati inoculati a 6 settimane di età e monitorati oltre le 10 settimane fino a quando uno di essi ha raggiunto criterio etico di interruzione degli esperimenti, nel quale l'intera coorte è stata sottoposta ad eutanasia. Essendo che un animale di questa coorte, sottoposto ad un dosaggio minore di costruito ha raggiunto le 18 settimane di età, ovvero il criterio etico, tutti gli animali appartenenti alla coorte 2, ovvero la sua, sono stati soppressi per collezionare i tessuti dopo le 12 settimane dalla somministrazione.

I dati riportati nella Tabella 1 mostrano che i modelli murini trattati con il vettore AAV hanno dimostrato un ottimo miglioramento nel peso corporeo rispetto a quelli trattati solo con il veicolo e in più, non sono stati riscontrati dei cambiamenti significativi confrontando il loro peso corporeo con quello di topi wild type.

4.3 Il trattamento AAV corregge il fenomeno cardiaco

Per controllare le funzioni cardiache, è stata impiegata un'ecocardiografia, metodo di ultrasuoni ad alta frequenza. Nei topi FXN-MCK trattati solamente con il veicolo, si è osservata una diminuita frazione di eiezione a 9–10 settimane di età, rispetto a quanto osservato nei topi wild type, con una significatività statistica particolarmente elevata ($p < 0.0001$). Nei topi FXN-MCK inoculati con AAV contenente la FXN umana (hFXN) o murina (mFXN), sia a dosaggio basso che alto, si è riscontrato un aumento evidente della frazione di eiezione, sempre monitorata fra le 9 e 10 settimane, rispetto ai topi trattati con veicolo ($p < 0.001$). Il miglioramento riscontrato è stato mantenuto fino all'ultima misurazione, svolta a 18–19 settimane, mentre non sono state osservate differenze significative tra i topi WT e quelli FXN-MCK trattati con AAV, ad indicare che il trattamento è stato abbastanza efficace da riportare i valori della frazione di eiezione a livelli simili a quelli riscontrati nei topi sani (**Figura 5**).

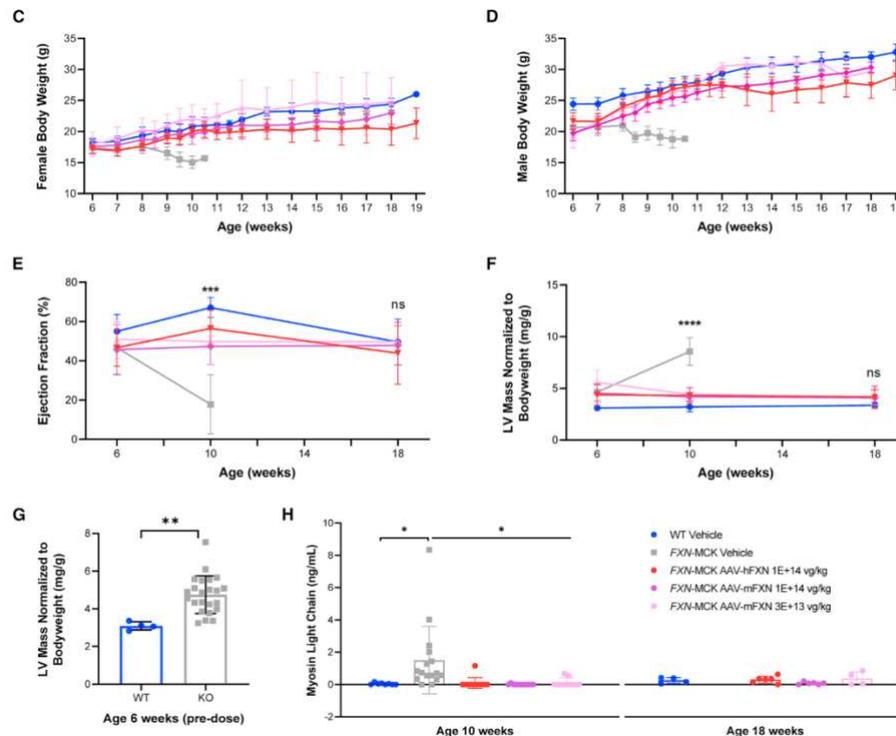


Figura 5. Analisi di peso corporeo, parametri cardiaci e biomarcatori

(C e D) peso corporeo medio per sesso e gruppo di trattamento \pm DS. Differenze significative sono state rilevate mediante test t di Student confrontando i topi FXN-MCK trattati con veicolo, o con i controlli WT dello stesso sesso a partire da 6 settimane di età nei maschi ($p < 0,001$) e da 7 settimane di età nelle femmine ($p < 0,05$). Non sono state rilevate differenze significative consistenti confrontando i topi FXN-MCK trattati con AAV-hFXN o AAV-mFXN con i controlli WT dello stesso sesso. (E) è stata osservata una riduzione significativa della frazione di eiezione media nei topi FXN-MCK trattati con veicolo a 9-10 settimane di età rispetto ai controlli WT trattati con veicolo ($p < 0,001$). Non sono state osservate differenze significative tra i controlli WT e i topi FXN-MCK trattati con AAV-hFXN o AAV-mFXN a 18-19 settimane di età. (F) dati rappresentati come massa ventricolare sinistra (LV) media normalizzata per peso corporeo per gruppo di trattamento a ciascun momento temporale. I dati sono stati analizzati mediante ANOVA a una via. Differenze significative sono state osservate tra i topi FXN-MCK trattati con veicolo e i controlli WT a 6 settimane di età ($p < 0,05$) e a 9-10 settimane di età ($p < 0,0001$). Nessuna differenza significativa è stata osservata tra i topi FN-MCK trattati con AAV e i controlli WT a 18-19 settimane di età. (G) massa ventricolare sinistra (LV) normalizzata per peso corporeo nei

topi FXN-MCK e WT prima del trattamento. Differenza significativa tra i topi FXN-MCK trattati con veicolo e i controlli WT a 6 settimane di età (test t Student; $p < 0,01$). (H) livelli sierici di catena leggera della miosina espressi come valori medi per gruppo di trattamento. I dati sono stati analizzati tramite ANOVA a una via rispetto al controllo trattato con veicolo a ciascun tempo. Differenze significative sono state osservate confrontando i topi FXN-MCK trattati con veicolo con i controlli WT ($p < 0,05$) e con i topi FXN-MCK trattati con AAV-hFXN e AAV-mFXN ($p < 0,05$) a 9-10 settimane di età. Nessuna differenza significativa è stata rilevata tra i topi trattati con AAV e i controlli WT a 18-19 settimane di età; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Come unità di misura dell'efficacia del trattamento tramite AAV, è stato utilizzato un rapporto fra il peso del cuore medio, il quale è stato normalizzato per il peso corporeo, e questa scelta deriva dal fatto che i topi FXN-MCK sviluppano un cuore ipertrofico e possiedono un basso peso corporeo; dunque, questa normalizzazione si può utilizzare per confronti. Questa normalizzazione risultava particolarmente più alta nei topi trattati solamente con il veicolo rispetto a quelli trattati con il vettore contenente il gene *FXN* e anche con quelli di controllo, valutato a 9 -10 settimane di età, mentre non sono state riscontrate significative differenze nella normalizzazione tra i topi trattati con AAV e quelli della stessa età di controllo, valutato a 18-19 WOA. Nel gruppo di topi trattati con il vettore, sono stati riscontrati diversi miglioramenti nella massa del ventricolo sinistro, sempre a seguito di normalizzazione, e gli stessi miglioramenti sono stati riscontrati anche nella frazione di accorciamento, monitorate entrambe tramite ecocardiografia, rispetto ai modelli FXN-MCK trattati solamente con il veicolo e, similamente a ciò sopraccitato, non sono invece state riscontrate differenze tra i topi FXN-MCK trattati con AAV e i topi di controllo wild type, sempre a 18-19 settimane di età, circa gli stessi parametri in esame. A 6 settimane di età la massa del ventricolo sinistro normalizzata al peso corporeo era molto più alta nei topi trattati solamente con il veicolo (4,6 mg/g) rispetto ai topi wild type (3,1 mg/g) e ciò è importante indicatore dell'anomalia cardiaca presente nei topi malati prima del trattamento; per quanto riguarda invece la frazione di eiezione, essa risultava lievemente inferiore (47%) nei modelli FXN-MCK, rispetto ai modelli selvatici (55%) sempre monitorando ciò nelle stesse settimane, ma questo risultato non è abbastanza significativo. L'analisi di questi dati dimostra che il trattamento tramite il vettore AAV ingegnerizzato con il gene per la proteina frataxina, permette effettivamente di correggere numerosi sintomi del fenotipo cardiaco. Inoltre, per avere la certezza di questi risultati e per dimostrare la sicurezza del trattamento tramite questo vettore virale, sono stati misurati anche biomarcatori cardiaci del siero alla fine dello studio. Tra i biomarcatori utilizzati, si riscontra la catena leggera della miosina, la quale viene utilizzata perché indicatore di danno al miocardio; essa ha subito un aumento significativo a 1,5 ng/ml nei topi trattati con il solo veicolo, rispetto ad un valore di 0,04 ng/ml, riscontrata nei topi selvatici (significatività del 3,8%) e di 0,096 o 0,01 ng/ml per quanto riguarda i modelli AAV-hFXN o AAV-mFXN, somministrati di una dose di $1E+14$ vg/kg, e ciò dimostra un andamento curativo e protettivo sul miocardio. Un altro marcatore utilizzato è la troponina cardiaca, per la quale si sono riscontrati i livelli di 0,46 ng/ millilitro, nei topi trattati con il solo veicolo, mentre essa non era rilevabile nei topi WT e, nei topi trattati con vettori virale alla stessa dose precedentemente citata, si è osservata una riduzione di questo biomarcatore fino a 0,05 e 0,2 ng/ ml (rispettivamente AAV-hFXN e AAV-mFXN).

Nonostante questi risultati siano effettivamente promettenti, le differenze non sono statisticamente abbastanza significative e potrebbero essere causate anche da *outliers*; inoltre, non sono state riscontrate differenze importanti, nemmeno nei livelli di creatina chinasi nel sangue analizzato alla fine dello studio, né di proteina legante acidi grassi 3, analisi svolte fra tutti i gruppi a 9-10 settimane di età (dati non mostrati).

4.4 Il trattamento AAV risulta in un'espressione di FXN funzionale

Per valutare l'avvenuta trasduzione di AAV8, sono state fatte analisi di qPCR, per quantificare le copie di esso (VCN) nel tessuto cardiaco. I risultati ottenuti sono quelli che ci si aspettava, ovvero nei topi trattati solamente con il vettore e in quelli selvatici non sono stati trovati i vettori a DNA mentre sono stati riscontrati nei topi trattati con il vettore AAV8 e si nota come la quantificazione sia dose dipendente ma non tempo dipendente; infatti, si riscontrano livelli diversi, in particolare maggiori nei topi trattati con dosaggi più alti ma non confrontandoli a settimane diverse (dati non mostrati). Per quanto riguarda invece i livelli di espressione della proteina, si riscontrano una media di 169,7 e 165,5 ng/mg nei topi wild type a 9-10 settimane e 18-19 settimane, mentre nei topi trattati con AAV/FXN, a diversi dosaggi e sia nella forma umana che murina, si riscontra un'espressione molto superiore: si parla di un aumento fino a 21,2 volte la quantità endogena nei topi AAV-mFXN con dosaggio $1E+14$ vg/kg a 12 settimane o di 5,1 volte la quantità endogena nei topi trattati con dosaggio minore, corrispondente a $3E+13$ vg/kg; questo aumento di espressione della proteina è stato riscontrato anche nel cervelletto, fegato, midollo spinale, e nel ganglio della radice dorsale (dati non mostrati). Successivamente per comprendere se entrambi i vettori, umano e murino, fossero in grado di esprimere la proteina funzionante *in vivo*, sono state svolte analisi di western blot per valutare i livelli dei complessi della catena di trasporto degli elettroni del mitocondrio. Si è notata un'espressione aumentata di complessi I e II in seguito al trattamento, che è risultato quindi funzionale anche per questo aspetto.

4.5 Il trattamento AAV risulta in una distribuzione ampia di fratassina nel cuore

Sono stati monitorati i livelli di espressione della proteina tramite indagine immunostochimica in campioni di tessuto cardiaco che ha evidenziato un'espressione leggera ma diffusa nei topi wild type, mentre in quelli FXN-MCK si è osservata un'espressione più intensa in molte zone ma non uniforme; diversamente, nei topi trattati solo con il veicolo non è stata rilevata affatto la presenza di questa proteina (**Figura 6**).

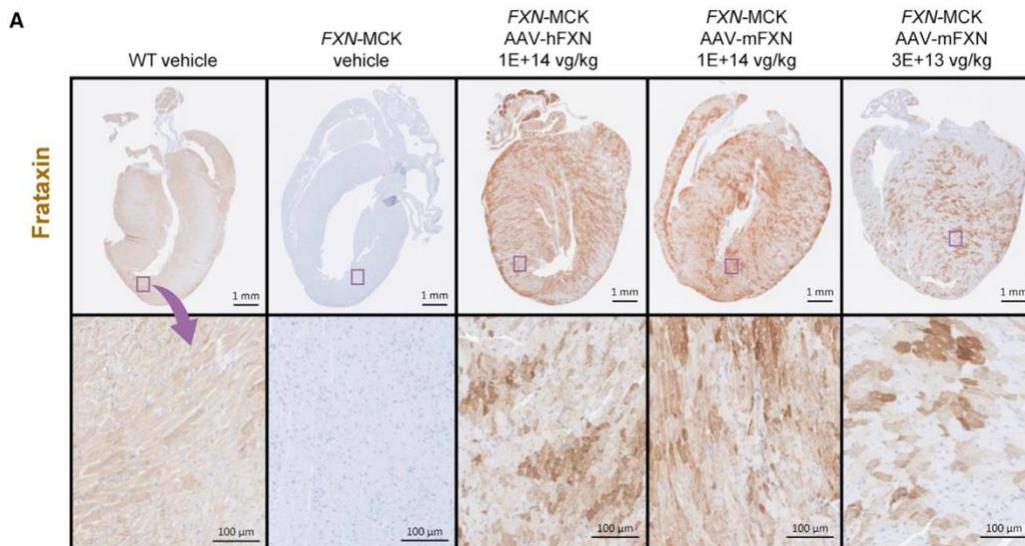


Figura 6. Espressione di FXN nel tessuto cardiaco: confronto fra topi WT, FXN-MCK e FXN-MCK trattati con AAV.

(A) campioni di tessuto cardiaco che mostrano l'espressione di FXN (IHC) nei topi WT e FXN-MCK trattati con veicolo e nei topi FXN-MCK trattati con AAV. Le immagini nella fila inferiore mostrano l'ingrandimento di un'area del campione direttamente sopra di essa (riquadro blu). Le barre di scala rappresentano 1 mm (fila superiore) e 100 μ m (fila inferiore).

Successivamente, si è impiegato un algoritmo, chiamato HALO, per fare un'analisi semiquantitativa; tramite questo algoritmo si è compreso che i topi FXN-MCK trattati con il veicolo a dosaggi bassi presentano una situazione simile a quella riscontrata nei topi di controllo (aree con FXN nei topi trattati con il trattamento= 58,6% e nei topi WT=54,4%), mentre nei topi ai quali è stata somministrata una dose elevata, si osserva un'espressione della proteina aumentata rispetto a quella dei topi selvatici (78,8% con gene murino e 84,5% con gene umano) (dati non mostrati). Questo suggerisce che la proteina FXN è prodotta più estensivamente, anche se non in modo omogeneo, grazie al trattamento con vettore AAV-FXN.

4.6 L'espressione di FXN non è stata associata a cardi tossicità

Dopo aver ottenuto questi risultati promettenti, è stato necessario valutare però che la sovraespressione della proteina data dalla somministrazione del vettore virale contenente il gene *FXN*, non risultasse in cardi tossicità e al fine di ciò sono state fatte delle colorazioni istologiche con ematossilina ed eosina. Tramite queste colorazioni sono state riscontrate le classiche alterazioni della cardiomiopatia nei topi FXN-MCK trattati solamente con veicolo (degenerazione dei cardiomiociti, infiltrazione di cellule mononucleate, fibrosi miocardica e trombi atriali), mentre nei topi selvatici si è osservata una piccolissima infiltrazione delle cellule mononucleate (2 su 4); viceversa, nei topi trattati con AAV-hFXN, nel dosaggio $1E+14$ vg/kg oppure con AAV-mFXN ad entrambe le dosi, si è riscontrata una leggera infiltrazione cellulare (5 su 17), nessuna degenerazione dei cardiomiociti, nessuna fibrosi e solo un caso di trombi atriali (dati non mostrati), perciò si può dedurre che il trattamento è stato efficace e non ha causato cardi tossicità, ma anzi ha protetto il tessuto cardiaco. Sono state fatte poi analisi su altri tessuti per verificare un'eventuale tossicità nel fegato, nel nervo sciatico, nel muscolo quadricipite, nel midollo spinale, nel diaframma, nel cervello e nei gangli della radice dorsale. Non sono stati riscontrati risultati che testimoniassero cambiamenti microscopici riconducibili alla tossicità in essi, tranne nei gangli della radice dorsale, dove si è osservato che un dosaggio alto di trattamento, causava vacuolizzazione nei gangli; ciò non è presente nei topi trattati con un dosaggio basso e, comunque, non causa un'effettiva degenerazione dei neuroni; perciò, non è possibile ricondurli a tossicità. Attraverso colorazioni per il ferro e colorazione Masson's trichrome, si è potuto ulteriormente osservare che il trattamento con AAV previene anche la fibrosi e l'accumulo di ferro, in quanto nei topi trattati, similmente ai topi sani, non è stato trovato un accumulo di ferro e la fibrosi è risultata quasi assente.

5. DISCUSSIONE

Lo scopo dello studio era quello di capire se la terapia tramite vettore virale AAV con gene *FXN*, a due diversi dosaggi, inoculata in topi sottoposti a knockout condizionale FXN-MCK, fosse efficace e sicura. È stato utilizzato il vettore nel sierotipo AAV8, in quanto, sulla base di studi precedenti, si è notato il suo tropismo per il muscolo cardiaco e inoltre, cosa da non sottovalutare, è stato verificato che esiste un livello di immunità contro di esso relativamente basso, cosa che, almeno a livello teorico, dovrebbe rappresentare una base di maggiore sicurezza dell'utilizzo di questo mezzo. Inoltre, è stata analizzata la proteina, nella sequenza aminoacidica, ottenuta dal transgene umano ed essa si è rivelata essere identica alla sequenza consenso della proteina endogena umana FXN. Sulla base di tutti questi risultati è stato possibile concludere che sia possibile indurre un'espressione *de novo* di fratassina, al fine di prevenire la progressione dei deficit cardiaci associati alla patologia e ciò risulta possibile anche dopo la comparsa dei primi sintomi, come i deficit della frazione di eiezione. Sono stati pubblicati ulteriori studi di test di questo costrutto in diversi modelli animali e tramite ulteriori mezzi di somministrazione: nella maggior parte dei casi ciò è risultato in un miglioramento generale dei sintomi della cardiomiopatia, della neurodegenerazione e

dell'estensione dell'aspettativa di vita. In realtà ci sono stati dei casi in cui questa terapia è risultata in una produzione eccessiva della proteina, fino a 20 volte l'espressione normale, e ciò è risultato in danno o interferenze con il funzionamento dei complessi I e II della catena di trasporto degli elettroni e dell'ultrastruttura mitocondriale e ha inoltre portato alla morte di cardiomiociti; questi risultati sono però stati ottenuti da costrutti che presentavano dei promotori sintetici molto forti come CAG, un *enhancer* di citomegalovirus fuso con il promotore del gene della beta actina di pollo. Perciò, per evitare questo risultato, è stato adottato un approccio basato su un vettore che contenesse un promotore costitutivo, umano e con una forza relativamente più bassa, scegliendo il promotore PGK. A maggior ragione si pensa che l'aggiunta degli elementi di regolazione o l'utilizzo del promotore della proteina FXN endogena, dovrebbero portare i livelli di espressione di essa molto vicini a quelli riscontrati nei modelli wild type. Sicuramente saranno necessari ulteriori test, svolti per un intervallo di tempo maggiore, all'incirca di sei mesi, e svolti su primati non umani, per valutare gli effetti della tossicità e del minimo dosaggio efficace nella produzione di una quantità minima sufficiente di fratassina. Uno degli argomenti principalmente indagati attualmente, riguarda il comprendere quali siano i livelli di espressione della proteina minimi efficaci per il funzionamento fisiologico dei mitocondri; a questo proposito si è notato che gli individui eterozigoti per questa mutazione sono indistinguibili dai wild type dal punto di vista del fenotipo fisico e anche di comportamento, perciò questi risultati sembrano suggerire che un'espressione della proteina al 50%, dovrebbe restituire degli effetti terapeutici significativi, perlomeno per quanto riguarda la reversione della cardiomiopatia associata a FRDA. Dalle analisi raccolte in questo caso di studio, si può concludere che l'impiego di un vettore AAV8 contenente il transgene *FXN*, sia nella forma umana che murina, somministrato in un singolo dosaggio, può prevenire o invertire i sintomi cardiaci della patologia, aumentare la sopravvivenza media e anche la morfologia cardiaca; perciò si può ipotizzare che questo approccio terapeutico potrebbe essere ben tollerato ed efficace nel trattamento di pazienti che sviluppano sintomi severi e molto spesso letali, con complicazioni cardiovascolari.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] Pignataro M.F., Noguera M.E., Herrera M.G., Roman E.A., Santos J. (2025). Frataxin: from the sequence to the biological role. *Biophysical Reviews*, 17:449–465. <https://doi.org/10.1007/s12551-025-01311-z>
- [2] Petrillo S., Piermarini E., Pastore A., Vasco G., Schirinzi T., Carrozzo R., Bertini E., Piemonte F. (2017). Nrf2-inducers counteract neuro-degeneration in frataxin-silenced motor neurons: disclosing new therapeutic targets for Friedreich's ataxia. *Int J Mol Sci*, 18:2173. <https://doi.org/10.3390/ijms18102173>
- [3] Pietrangeli P., Marcocci L., Pennacchietti V., Diop A., Di Felice M., Pagano L., Malagrino F, Toto A., Brunori M., Gianni S. (2024). The mechanism of folding of human frataxin in comparison to the yeast homologue - broad energy barriers and the general properties of the transition state. *J Mol Biol* 436:168555. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2024.168555>
- [4] Somanathan S., Calcedo R., Wilson, J. M. (2020). Adenovirus–Antibody complexes contributed to lethal systemic inflammation in a gene therapy trial. *Molecular Therapy*, 28(3),784-793. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.01.006>
- [5] Mao J.H., Shen Y., Wang Q., Wang Y., Ruan Z., Xi X. (2020). Optimized AAV package and experimental application of recombinant AAV8/hFVIII for gene therapy on hemophilia A mice. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*,41(1):34-39. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2020.01.007>
- [6] Casazza J.P., Cale E.M., Narpala S., et al. (2022). Safety and tolerability of AAV8 delivery of a broadly neutralizing antibody in adults living with HIV: a phase 1, dose-escalation trial. *Nat Med*, 28(5):1022-1030 <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01762-x>
- [7] Reetz K., Lischewski S.A., Dogan I., Didszun C., Pishnamaz M., Konrad K., Marx-Schütt K., Farmer J., Lynch D.R., Corben L.A., Pandolfo M., Schulz J. B. (2025). Friedreich's ataxia—a rare multisystem disease. *The Lancet Neurology*, 24(7), 614–624. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(25\)00175-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(25)00175-9)
- [8] Takazaki K.A.G., Quinaglia T., Venancio T.D., Martinez A.R.M., Shah R.V., Neilan T.G., Jerosch-Herold M., Coelho-Filho O.R., França Jr M.C. (2021). Pre-clinical left ventricular myocardial remodeling in patients with Friedreich's ataxia: A cardiac MRI study. *PLoS ONE*, 16(3): e0246633. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246633>
- [9] Gérard C., Xiao X., Filali M., Coulombe Z., Arsenault M., Couet J., Li J., Drolet M.C., Chapdelain P., Chikh, A., and Tremblay J.P. (2014). An AAV9 coding for fra-taxin clearly improved the symptoms and prolonged the life of Friedreich ataxia mouse models. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 1, 14044. <https://doi.org/10.1038/mtm.2014.44>

7. APPENDICE

Si riporta di seguito l'articolo discusso

AAV8 gene therapy reverses cardiac pathology and prevents early mortality in a mouse model of Friedreich's ataxia

Joshua C. Chang,¹ Molly R. Ryan,¹ Marie C. Stark,¹ Su Liu,¹ Pravinkumar Purushothaman,² Fria Bolan,¹ Caitlin A. Johnson,¹ Mark Champe,¹ Hui Meng,^{3,4} Michael W. Lawlor,^{3,4} Sarah Halawani,⁵ Lucie V. Ngaba,⁵ David R. Lynch,⁵ Crystal Davis,⁶ Elena Gonzalo-Gil,⁶ Cathleen Lutz,⁶ Fabrizia Urbinati,² Bala Medicherla,¹ and Carlos Fonck¹

¹Astellas Gene Therapies, Inc., South San Francisco, CA 94080, USA; ²Formerly of Astellas Gene Therapies, Inc., South San Francisco, CA 94080, USA; ³Diverse Translational Science Laboratory, Milwaukee, WI 53204, USA; ⁴Medical College of Wisconsin, Department of Pathology and Laboratory Medicine, Milwaukee, WI 53226, USA; ⁵Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia, PA 19104, USA; ⁶The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME 04609, USA

Friedreich's ataxia (FRDA) is an autosomal-recessive disorder primarily attributed to biallelic GAA repeat expansions that reduce expression of the mitochondrial protein frataxin (FXN). FRDA is characterized by progressive neurodegeneration, with many patients developing cardiomyopathy that progresses to heart failure and death. The potential to reverse or prevent progression of the cardiac phenotype of FRDA was investigated in a mouse model of FRDA, using an adeno-associated viral vector (AAV8) containing the coding sequence of the FXN gene. The *Fxn*^{fllox/mull}::MCK-Cre conditional knockout mouse (FXN-MCK) has an FXN gene ablation that prevents FXN expression in cardiac and skeletal muscle, leading to cardiac insufficiency, weight loss, and morbidity. FXN-MCK mice received a single intravenous injection of an AAV8 vector containing human (hFXN) or mouse (mFXN) FXN genes under the control of a phosphoglycerate kinase promoter. Compared to vehicle-treated FXN-MCK control mice, AAV-treated FXN-MCK mice displayed increases in body weight, reversal of cardiac deficits, and increases in survival without apparent toxicity in the heart or liver for up to 12 weeks postdose. FXN protein expression in heart tissue was detected in a dose-dependent manner, exhibiting wide distribution throughout the heart similar to wild type, but more speckled. These results support an AAV8-based approach to treat FRDA-associated cardiomyopathy.

INTRODUCTION

Friedreich's ataxia (FRDA) is an autosomal-recessive disorder caused by biallelic GAA trinucleotide repeat expansions of the frataxin (FXN) gene.¹ This intronic mutation diminishes FXN protein expression, which in most patients ranges from 2% to 30% of normal levels.^{1,2} FXN is a highly conserved mitochondrial protein that is involved in the assembly of the iron-sulfur complex, an important component in electron transport chain complexes I and II.³ Reduced FXN levels can result in iron accumulation in mitochondria with

consequent oxidative damage and decreased ATP production, all of which can ultimately lead to cell death in vulnerable tissues,^{4,5} such as the central and peripheral nervous systems, heart, and pancreas.⁵ With an estimated prevalence of 1 in 40,000, FRDA is the most commonly inherited ataxia among people of European ancestry.^{6,7}

Although neurological deficits are the hallmark of FRDA, the disease causes multisystemic deficits, including cardiomyopathy and glucose intolerance.⁸ FRDA onset occurs typically during late childhood to adolescence, with disease progression sometimes leading to premature death between 35 and 45 years of age.^{5,8,9} Heart disease in FRDA initially presents as concentric and hypertrophic cardiomyopathy, eventually progressing to dilated cardiomyopathy over time; some patients suffer embolic strokes and mural thrombi in the left ventricle.^{5,9} Histological changes in the left ventricle typically consist of cellular hypertrophy, diffuse fibrosis, and focal myocardial necrosis.^{7,6,11} The most frequent cause of death in FRDA results from congestive heart failure or arrhythmia (59%).⁹

Given that FRDA is a monogenic loss-of-function disease, one promising disease-modifying therapeutic approach to treat FRDA is adeno-associated viral vector (AAV)-mediated gene transfer.¹² Previously published studies using AAV-mediated gene therapy administered to cardiac or neurological mouse models of FRDA have shown therapeutic benefit.^{13–15} In terms of identifying minimally therapeutic levels of AAV-mediated FXN expression, it is worth noting that heterozygous FXN-knockout mice are indistinguishable from their wild-type (WT) littermates. Likewise, human heterozygous carriers manifest no clinical symptoms.¹⁶ These observations suggest that expressing half of the endogenous FXN level may be sufficient to

Received 22 June 2023; accepted 18 January 2024;
<https://doi.org/10.1016/j.omtm.2024.101193>

Correspondence: Carlos Fonck, Astellas Gene Therapies, Inc., 225 Gateway Blvd., South San Francisco, CA 94080, USA.
E-mail: carlos.fonck@astellas.com



prevent or halt disease progression. In addition, recent reports have shown that FXN overexpression can cause toxicity both *in vitro* and *in vivo*.^{17–19}

In the present study, and to avoid potential toxicity due to high FXN expression, a relatively low-strength, nonviral, phosphoglycerate kinase (PGK) promoter was selected.²⁰ AAV8 vectors were designed to contain single-stranded DNA with codon-optimized (co) human (hFXNco) or mouse FXN (mFXNco) genes, which were evaluated in a cardiac mouse model of FRDA, the *Fxn*^{fl^{ox}/null}::MCK-Cre conditional knockout (*FXN*-MCK).²¹ Due to FXN protein deficiency in both heart and skeletal muscle, these *FXN*-MCK mice exhibit progressive weight loss associated with cardiac deficits leading to morbidity at approximately 10 weeks of age (WOA). With the AAV treatment, all *FXN*-MCK mice survived through 10 WOA with improved cardiac function and morphology, with FXN protein expressed in a widely distributed pattern throughout the heart, similar to that of WT but more speckled.

RESULTS

Vector and viral constructs

To investigate the potential of AAV-based gene therapy to treat FRDA-associated cardiomyopathy, an AAV8 vector containing co cDNAs of either hFXNco or mouse FXN (mFXNco) genes were designed under the control of a human 3-PGK promoter: AAV8-hPGK-hFXNco (AAV-hFXN) and AAV8-hPGK-mFXNco (AAV-mFXN) vectors (Table S1). The DNA construct was originally subcloned into a proprietary plasmid including the viral inverted terminal repeat (ITR). RNA processing was supported by the presence of an intron and a polyadenylation signal, both from the simian virus 40 (SV40) (Figure 1A).²²

AAV treatment efficiently transduces mouse and human cell lines and leads to robust expression of mature FXN

C2C12 (immortalized mouse myoblast) cells were transduced by the AAV-hFXN vector, and FXN expression was detected in the cytoplasm by immunofluorescence (IF) (Figure 1B). Quantification of IF analysis revealed dose-dependent FXN protein expression with a half-maximal effective concentration (EC_{50}) at a MOI of $1.16E+5$ viral genomes (vg)/cell and a plateau at $1E+6$ vg/cell (Figure 1C). AAV-hFXN-driven *FXN* mRNA also showed a dose-dependent response, although without a plateau (Figure 1D). *FXN* mRNA production and protein expression were strongly correlated with a coefficient of determination (R^2) value of 0.94 (Figure 1E). To confirm that FXN expressed from the AAV-hFXN cDNA was correctly processed, western blot analysis was performed. The full-length 210-amino acid form of hFXN is expressed in the cytoplasm of cells, rapidly translocating to the mitochondria, where it undergoes conversion to the intermediate form (42–210) and then the mature form (81–210) through the action of a mitochondrial processing peptidase.^{23,24} The size of mature hFXN is ~ 14 kDa.²³ Western blot results not only confirmed dose-dependent FXN expression at MOIs of $1E+6$ or $1E+7$ vg/cell, but also showed the 14-kDa fully mature form of FXN (Figure 1F).²⁵ The antibody used detects all three FXN forms,

including full, intermediate, and mature species, but cannot reliably quantify relative amounts. To confirm that AAV-hFXN could also transduce human cell lines, AC16 (immortalized human cardiomyocyte) cells were transduced with AAV-hFXN at MOIs of $1E+5$, $1E+6$, or $1E+7$ vg/cell. Imaging of transduced AC16 cells showed that FXN was localized to the cytoplasm and quantitative IF demonstrated MOI concentration-dependent FXN expression (Figures S1A and S1B).

AAV treatment prolongs survival and maintains body weight

FXN-MCK mice, a tissue-specific *FXN*-knockout in cardiac and skeletal muscle, was selected as an animal model to evaluate the potential for phenotypic rescue of FRDA cardiomyopathy by AAV-hFXN and AAV-mFXN (Figure 2A; Table S1). The *FXN*-MCK mouse phenotype includes functional cardiac deficits, such as decrease of ejection fraction, which are likely associated with progressive weight loss and morbidity (Figure 2B). All of the vehicle-treated *FXN*-MCK mice became moribund and had to be sacrificed before 10 WOA, consistent with the published literature and The Jackson Laboratory's historical data.^{21,26} Strikingly, all of the *FXN*-MCK mice treated at 6 WOA with AAV-hFXN or AAV-mFXN at doses of $3E+13$ vg/kg or $1E+14$ vg/kg survived until the planned necropsy at 10 WOA (cohort 1; 4 weeks postdose), as did all of the vehicle-treated WT control mice (Figure 2B). Animals in cohort 2 were designed to be continually monitored beyond 10 WOA until one animal reached humane endpoint, at which time the entire cohort would be euthanized (Figure 2A; Table S2). One animal in the AAV-mFXN lower-dose group ($3E+13$ vg/kg) reached humane endpoint at 18 WOA; therefore, the entire cohort 2 was euthanized for the second time point at 12 weeks postdose despite their body condition scores (BCSs) being within the normal range (Figure 2A).²⁷ AAV-treated *FXN*-MCK mice showed a statistically significant improvement in average body weight compared to vehicle-treated *FXN*-MCK mice (Figures 2C and 2D). No significant body weight differences were noted between AAV-treated *FXN*-MCK mice and sex-matched WT controls. No body weight data were collected from vehicle-treated *FXN*-MCK mice after 10 WOA due to mortality.

AAV treatment corrects cardiac phenotype

Cardiac function was monitored by echocardiography (high-frequency ultrasound). Significant reductions in ejection fraction were noted in vehicle-treated *FXN*-MCK mice at 9–10 WOA compared with WT controls ($p < 0.0001$). *FXN*-MCK mice that received either AAV-hFXN or AAV-mFXN at both lower and higher doses showed a significant increase in ejection fraction at 9–10 WOA compared to the vehicle-treated *FXN*-MCK mice ($p < 0.001$), which was maintained until the final measurement at 18–19 WOA (Figure 2E). There were no significant differences between WT controls and AAV-treated *FXN*-MCK mice at the final time point.

Average heart weight normalized to body weight was used as a measure of AAV-mediated efficacy given that *FXN*-MCK mice develop cardiac hypertrophy and have relatively low body weight.^{21,26} The average heart weight normalized to body weight was significantly ($p < 0.0001$) higher in vehicle-treated *FXN*-MCK mice compared

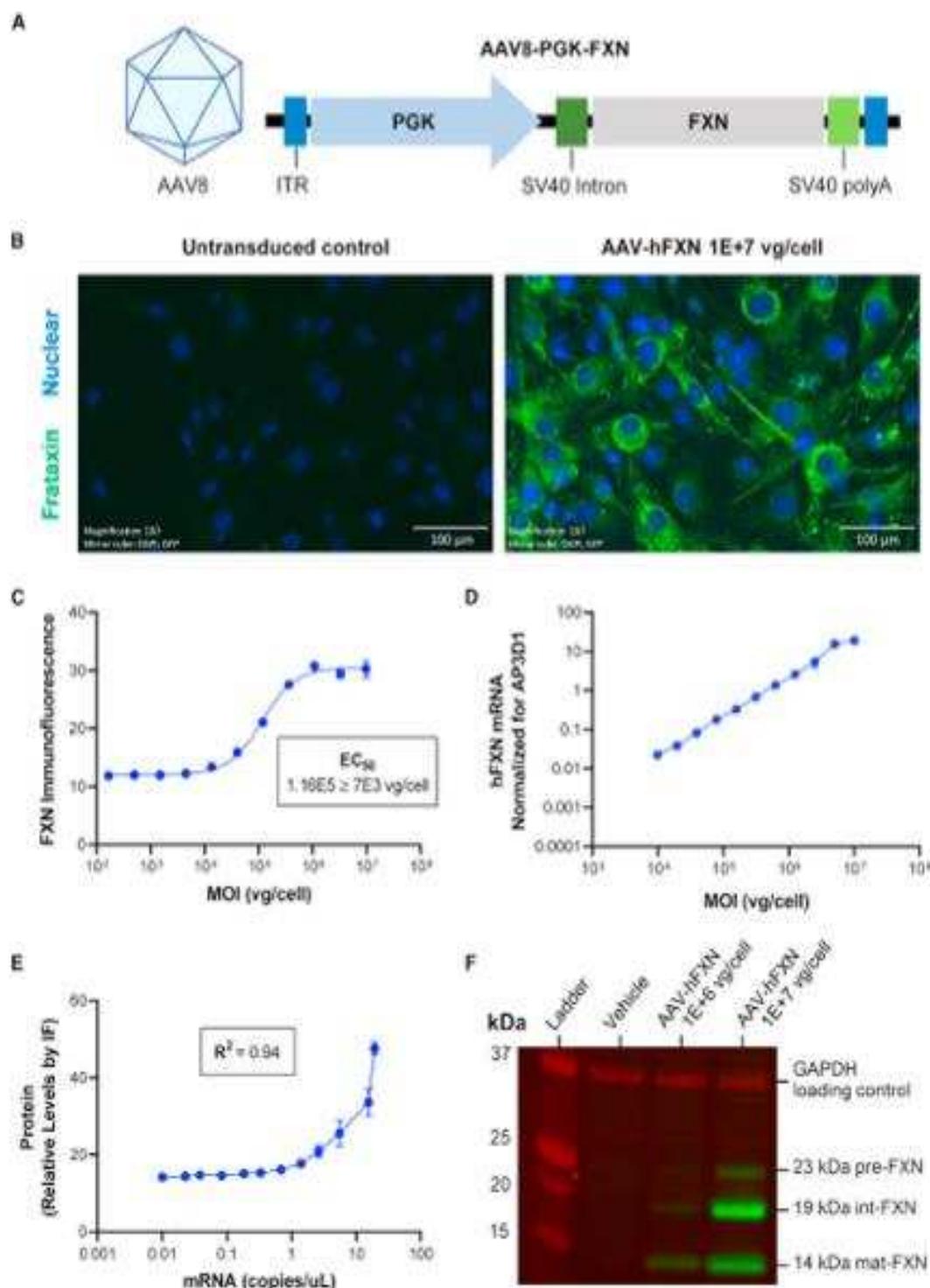
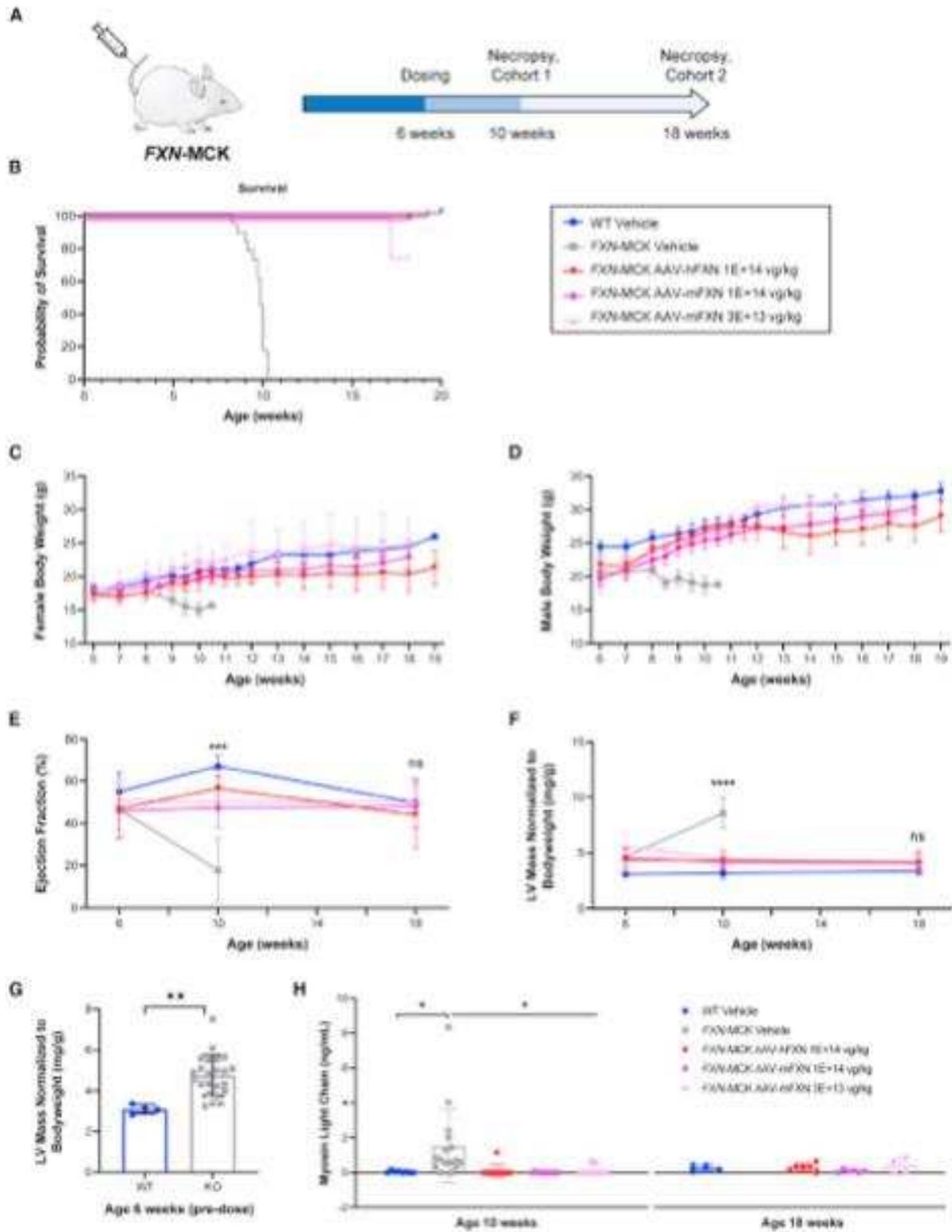


Figure 1. AAV FXN expressing construct and in vitro testing

(A) Structure of the AAV FXN-expressing construct. (B) Representative IF image of C2C12 cells treated with 1E+7 vg/cell AAV-hFXN or untransduced negative control of FXN (green) and nucleus (blue). Scale bars represent 100 μ m. (C) Dose-response curve of FXN IF intensity to AAV-hFXN MOI (vg/cell) fit with 4PL equation to determine EC_{50} value. (D) Log-log plot of AAV-hFXN-driven FXN mRNA expression as a function of AAV-hFXN MOI (vg/cell). (E) Correlation plot of mRNA and protein expression following AAV-hFXN transduction. (F) Western blot probing for FXN (green) and GAPDH loading control (red). Images on the LI-COR Odyssey system. Graphs were plotted using GraphPad Prism. IF, immunofluorescence; MOI, multiplicity of infection; polyA, polyadenylation signal.



(legend on next page)

with AAV-treated FXN-MCK mice and sex-matched WT control mice at 9–10 WOA (Figure S2A). There were no significant differences in normalized heart weights between AAV-treated FXN-MCK mice and age-matched WT controls at 18–19 WOA (Figure S2A). Significant improvements in left ventricular mass normalized to body weight ($p < 0.0001$) and fractional shortening ($p < 0.001$) from echocardiography were also observed in AAV-treated FXN-MCK mice compared to vehicle-treated FXN-MCK mice at 9–10 WOA. No significant differences were observed between AAV-treated FXN-MCK mice and WT controls at 18–19 WOA (Figures 2F and S2B). More important, there was a significant difference in the left ventricular mass normalized to body weight between vehicle-treated FXN-MCK mice (4.6 mg/g) and WT control mice (3.1 mg/g) before 6 WOA ($p < 0.01$) (Figure 2G), indicating that the cardiac abnormality in FXN-MCK mice developed before AAV treatment. Ejection fraction was also reduced from 55% to 47% in WT control mice compared to FXN-MCK mice at 6 WOA, although the difference was not statistically significant (Figure S2C). Together, these results show that AAV treatment resulting in *de novo* FXN expression in FXN-MCK mice enabled the rescue of important aspects of the cardiac phenotype.

To further investigate potential improvements of cardiac condition and to assess the safety of the AAV treatment, terminal serum cardiac biomarkers were measured. Myosin light chain, a biomarker that reflects myocardial damage, increased significantly to 1.5 ng/mL in vehicle-treated FXN-MCK mice, compared to the WT level of 0.04 ng/mL ($p = 0.038$). Animals treated with AAV-hFXN or AAV-mFXN at a dose level of $1E+14$ vg/kg showed reductions to 0.096 or 0.01 ng/mL, respectively ($p = 0.019$ and $p = 0.014$, respectively) (Figure 2H). Vehicle-treated FXN-MCK mice exhibited a cardiac troponin (cTnI) level of 0.46 ng/mL, whereas it was undetectable in the WT mice. Following treatment with AAV-hFXN or AAV-mFXN at a dose of $1E+14$ vg/kg, there was a trend toward cTnI reduction of 0.05 and 0.2 ng/mL, respectively. However, it is noteworthy that no statistically significant differences were detected ($p = 0.67$

and $p = 0.92$, respectively), potentially due to the presence of outliers in the dataset (Figure S2D). No significant differences were observed in terminal serum creatine kinase or fatty acid binding protein 3 levels across all groups at 9–10 WOA (Figure S2E and S2F).

AAV treatment results in functional FXN expression

To demonstrate AAV8 transduction, qPCR analysis was performed to measure vector copy number (VCN) in the following tissues. As expected, heart tissue from vehicle-treated FXN-MCK mice and WT mice contained no vector DNA. For cohort 2 vehicle-treated FXN-MCK mice, qPCR analysis was performed at 10 WOA and not at the scheduled necropsy at 18 WOA, due to mortality. There was no significant difference in heart VCN levels between animals dosed with AAV-mFXN or AAV-hFXN at $1E+14$ vg/kg at any postdose time point (Figures 3A and 3B). Animals treated with AAV-hFXN vector at $1E+14$ vg/kg showed similar transduction as assessed by VCN from the two time points, 1.5 vg/diploid genome (dg) at 4 weeks postdose and 1.29 vg/dg at 12 weeks postdose. Similar results were obtained with AAV-mFXN treatment at $1E+14$ vg/kg from the two time points, 1.12 vg/dg at 4 weeks postdose and 1.58 vg/dg at 12 weeks postdose. As expected, mice treated with a lower dose of $3E+13$ vg/kg AAV-mFXN vector had a lower VCN of 0.77 vg/dg at 4 weeks postdose and 0.3 vg/dg at 12 weeks postdose. Differences in heart VCN between the lower and higher AAV-mFXN doses were only statistically significant in cohort 2 at 12 weeks postdose ($p = 0.003$). Together, these data suggest a trend by which tissue transduction with AAV-FXN is dose dependent but not time dependent (within 12 weeks postdose) in the hearts of FXN-MCK mice (Figures 3A and 3B; Tables S3 and S4).

In terms of FXN protein expression, an average of 169.7 and 165.5 ng/mg of endogenous FXN was measured in the hearts of WT mice at 9–10 WOA and 18–19 WOA (Figures 3C and 3D; Tables S3, S5, and S6). In contrast, AAV-driven FXN protein expression in FXN-MCK mice, at any of the doses tested, was higher or similar compared to WT levels, in a dose-dependent manner. In

Figure 2. Survival, body weight, cardiac imaging, and cardiac biomarkers

(A) *In vivo* mouse proof of concept study design: FXN-MCK mice were intravenously dosed at 6 WOA. Cohort 1 mice were euthanized at 10 WOA. Cohort 2 mice were monitored beyond 10 WOA until one animal in the cohort reached humane endpoint and the entire cohort was euthanized, which happened at 18 WOA. (B) The probability of survival was significantly lower in vehicle-treated FXN-MCK mice compared to AAV-treated FXN-MCK mice and WT control mice. Data are represented as the age at which mice were euthanized if the animals displayed poor conditions, as described in Materials and Methods. (C and D) Average body weights per sex and treatment group \pm SD. Significant differences noted by Student's *t* test when comparing vehicle-treated FXN-MCK mice to sex-matched WT controls starting at 6 WOA in males ($p < 0.001$) and 7 WOA in females ($p < 0.05$). No consistent significant differences found when comparing AAV-hFXN- or AAV-mFXN-treated FXN-MCK mice to sex-matched WT controls. (E) Significant reduction in average percentage ejection fraction was noted in vehicle-treated FXN-MCK mice at 9–10 WOA compared to the vehicle-treated WT control ($p < 0.0001$), AAV-hFXN-treated ($p < 0.0001$), and AAV-mFXN-treated groups ($p < 0.001$). No significant differences were observed between WT controls and AAV-hFXN- or AAV-mFXN-treated FXN-MCK mice at 18–19 WOA. (F) Data represented as average left ventricular (LV) mass normalized to body weight per treatment group at each time point. Data were analyzed using 1-way ANOVA. Significant difference between vehicle-treated FXN-MCK mice compared to WT control at 6 WOA ($p < 0.06$) and at 9–10 WOA ($p < 0.0001$). Significant differences also noted between vehicle-treated FXN-MCK mice and AAV-mFXN- and AAV-hFXN-treated FXN-MCK mice at 9–10 WOA ($p < 0.0001$). No significant differences noted between AAV-hFXN- or AAV-mFXN-treated FXN-MCK mice and age-matched WT controls at 18–19 WOA. (G) LV mass normalized to body weight of FXN-MCK mice and WT mice before treatment. Significant difference between vehicle-treated FXN-MCK mice compared to WT control at 6 WOA (Student's *t* test; $p < 0.01$). (H) Myosin light chain serum level as average values per treatment group. Data analyzed by 1-way ANOVA compared to vehicle control at each time point. Significant differences were noted in myosin light chain levels when comparing vehicle-treated FXN-MCK mice to WT controls ($p < 0.05$) or to AAV-hFXN- and AAV-mFXN-treated FXN-MCK mice ($p < 0.05$) at 9–10 WOA. No significant differences noted between AAV-hFXN- or AAV-mFXN-treated FXN-MCK mice and age-matched WT controls at 18–19 WOA. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

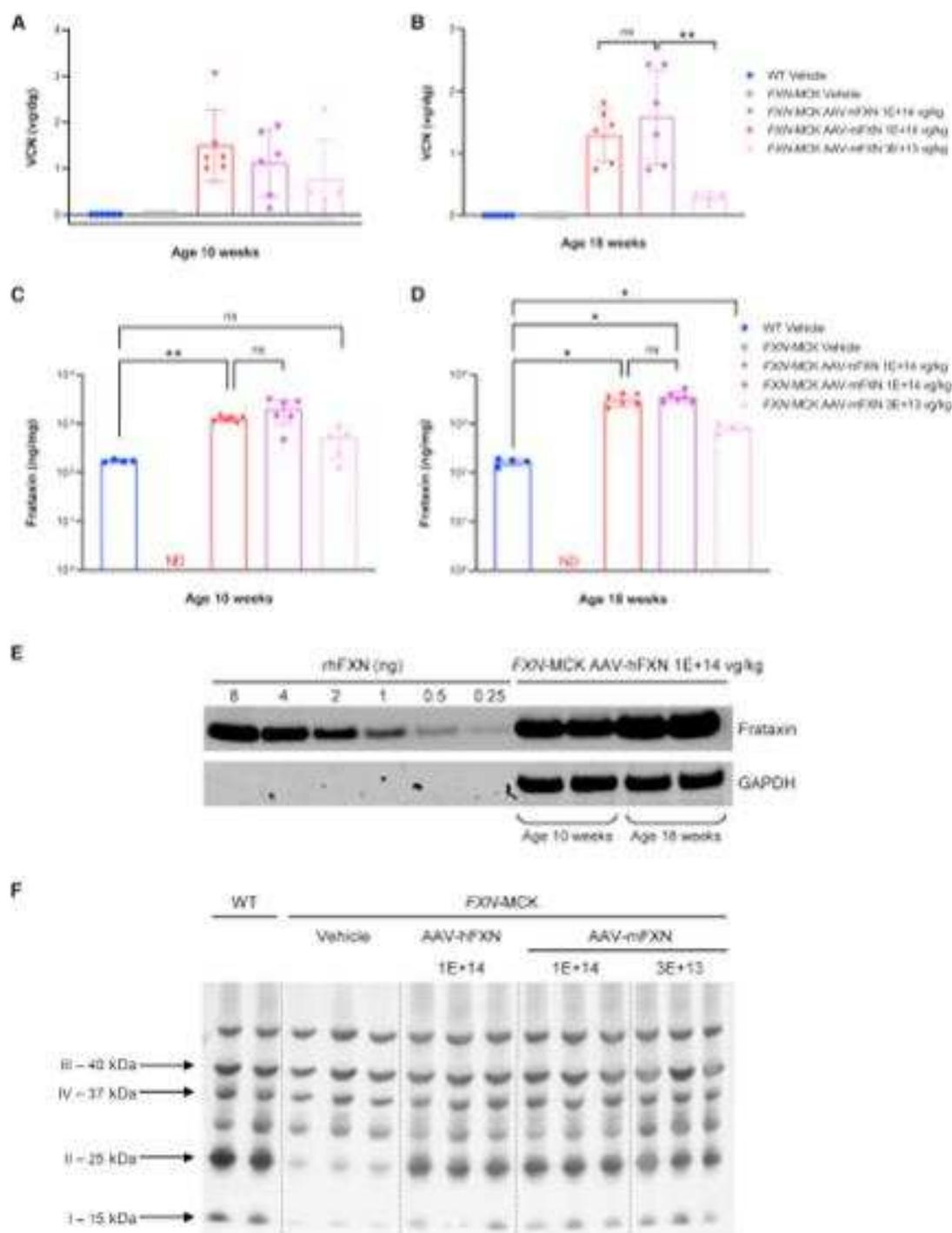


Figure 3. AAV transduction and FXN expression in the FXN-MCK mouse model

(A and B) VCN per group in mouse heart samples at 4 weeks postdosing (A) and 12 weeks postdosing (B). (C and D) FXN protein expression per group in mouse heart samples at 4 weeks postdosing (C) and 12 weeks postdosing (D). (B and D) All of the animals in cohort 2 survived until 18 WOA, except vehicle-treated FXN-MCK mice, which were terminated at 10 WOA due to mortality phenotype. Data are mean \pm SD, where columns represent means, error bars represent SDs, and each point represents an

(legend continued on next page)

the hearts of *FXN*-MCK mice, a higher dose of $1\text{E}+14$ vg/kg AAV-hFXN resulted in FXN protein expression 7.3-fold higher compared to WT levels at 4 weeks postdose ($p = 0.0047$), which increased to 17.9-fold at 12 weeks postdose ($p < 0.0001$). Similar levels of FXN in heart tissue were measured following AAV-mFXN treatment at a higher dose of $1\text{E}+14$ vg/kg, reaching 12- or 21.2-fold increases compared to WT levels at 4 or 12 weeks postdose (both $p < 0.0001$), respectively. There was no significant difference in expression between AAV-hFXN and AAV-mFXN at the same dose of $1\text{E}+14$ vg/kg at either 4 weeks ($p = 0.1442$) or 12 weeks postdose ($p = 0.4509$). At the lower dose level of $3\text{E}+13$ vg/kg, FXN expression in heart tissue was found to be 3-fold higher than WT levels at 4 weeks postdose, although the difference was not statistically significant. At 12 weeks postdose, the expression was increased to 5.1-fold above WT levels (Figures 3C and 3D; Table S5). FXN protein expression levels were also increased in AAV-treated *FXN*-MCK mice in the cerebellum, dorsal root ganglion (DRG), liver, and spinal cord at 12 weeks postdose (Figure S3A; Table S5).

To understand whether both human and mouse vectors could express the functional transgene containing the mature form of FXN *in vivo*, we performed western blot analysis on heart tissues. Protein bands of similar size (~ 14 kDa) to the positive control,²⁵ a recombinant human mature form of FXN (rhFXN), were detected in every heart tissue sample from AAV-treated *FXN*-MCK mice, but not in vehicle-treated *FXN*-MCK mice (Figures 3E and S3B–S3E). These results suggest that both AAV-driven mFXN and full-length hFXN could be cleaved by the mitochondrial processing peptidase to convert into the mature mitochondrial form.²⁵ To test the functional contribution of AAV-mFXN and AAV-hFXN at a cellular level, the immunoreactive levels of the mitochondrial electron transport chain complexes were examined. Associated with FXN deficiency, vehicle-treated *FXN*-MCK mice had a downregulation of complexes I and II compared with the vehicle-treated WT mice. In the same heart tissues in which the AAV-driven mature mitochondrial form of FXN was detected, the expression of complexes I and II were restored with the AAV treatment demonstrating functionality of the restored FXN (Figures 3F and S3F).

AAV treatment results in broad distribution of expressed FXN in the heart

Immunohistochemistry (IHC) for FXN confirmed FXN expression in the hearts of AAV-treated *FXN*-MCK mice with a broad distribution pattern. Cardiac tissue from vehicle-treated WT mice displayed a diffuse light level of positivity that was fairly uniform throughout the heart, whereas AAV-treated *FXN*-MCK hearts showed regional variability, with a greater staining intensity in many areas than was observed in vehicle-treated WT hearts. FXN expression was not detected in vehicle-treated *FXN*-MCK mice (Figure 4A).

For semiquantitative analysis, expression levels of FXN⁺-stained areas were defined as weak, moderate, and strong by the HALO algorithm. The percentage of area exhibiting weak FXN expression was 35.1% of the total heart section area analyzed in *FXN*-MCK mice that received $3\text{E}+13$ vg/kg AAV-mFXN. Following a higher dose of $1\text{E}+14$ vg/kg, areas corresponding to weak FXN expression were greater, 41.0% and 40.7% for AAV-mFXN and AAV-hFXN treatment, respectively, percentages that were similar to the WT endogenous FXN level, at 43.3% (Figure 4B; Table S7). The percentage of area exhibiting moderate FXN expression was similar or slightly greater in *FXN*-MCK mice that received $3\text{E}+13$ vg/kg AAV-mFXN at 12.5% compared to vehicle-treated WT mice at 10.0%. Following a higher dose of $1\text{E}+14$ vg/kg, the areas corresponding to moderate FXN expression increased to 20.3% and 23.0% for AAV-mFXN and AAV-hFXN treatment, respectively (Figure 4B). The percentage of areas exhibiting strong FXN expression were greater for all of the treatment groups, at 11.0% for $3\text{E}+13$ vg/kg AAV-mFXN treatment and 17.5% and 20.7% for $1\text{E}+14$ vg/kg AAV-mFXN and AAV-hFXN treatment, respectively, compared to vehicle-treated WT mice at 1.1% (Figure 4B). Overall, the total percentage of areas exhibiting FXN expression were similar between AAV-treated *FXN*-MCK mice that received the lower dose of $3\text{E}+13$ vg/kg at 58.6% and the vehicle-treated WT mice at 54.4%, and increased to 78.8% and 84.5% when treated at a higher dose of $1\text{E}+14$ vg/kg AAV-mFXN and AAV-hFXN, respectively (Figure 4B). Consistent with the ELISA data, the IHC results showed dose-dependent FXN protein expression, and semiquantitative image analysis revealed a broad distribution of FXN transgene expression similar to WT endogenous expression, although it was more speckled.

FXN expression was not associated with cardiotoxicity

To evaluate histological changes that constitute efficacy and distinguish those from potential changes that may represent test article-induced toxicity, H&E staining on tissue sections with microscopic evaluation was done. Microscopic changes in the hearts of vehicle-treated *FXN*-MCK mice were consistent with the cardiomyopathy that is expected in an animal model of FRDA, including degenerating cardiomyocytes that were present in all of the animals evaluated (5/5 animals scored), mononuclear cell infiltration (4/5), myocardial fibrosis (3/5), and atrial thrombi (2/5). Minimal mononuclear cell infiltration was noted in vehicle-treated WT mice (2/4). In contrast, *FXN*-MCK mice that received AAV-hFXN at $1\text{E}+14$ vg/kg or AAV-mFXN at $3\text{E}+13$ vg/kg or $1\text{E}+14$ vg/kg showed reduced cardiomyocyte degeneration (0/17), mononuclear cell infiltration (5/17), myocardial fibrosis (0/17), or atrial thrombi (1/17) at 4 weeks postdose, indicating efficacy (Table 1).

Off-target tissues, including liver, sciatic nerve, quadriceps muscle, spinal cord, diaphragm, DRG, and brain, were evaluated for

individual animal; data were analyzed by mixed-effects analysis 1-way ANOVA of Tukey multiple comparisons test. (E) Representative western blot demonstrated a protein band at the same size as the rhFXN detected in heart tissue protein samples from *FXN*-MCK mice receiving AAV-hFXN at $1\text{E}+14$ vg/kg at 4 weeks postdosing and 12 weeks postdosing. (F) Associated with FXN deficiency, *FXN*-MCK mice have a downregulation of immunoreactive levels of complexes I and II compared with WT. Expression of AAV FXN restores complex I and II levels to near normal. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. ND, nondetectable; ns, not significant.

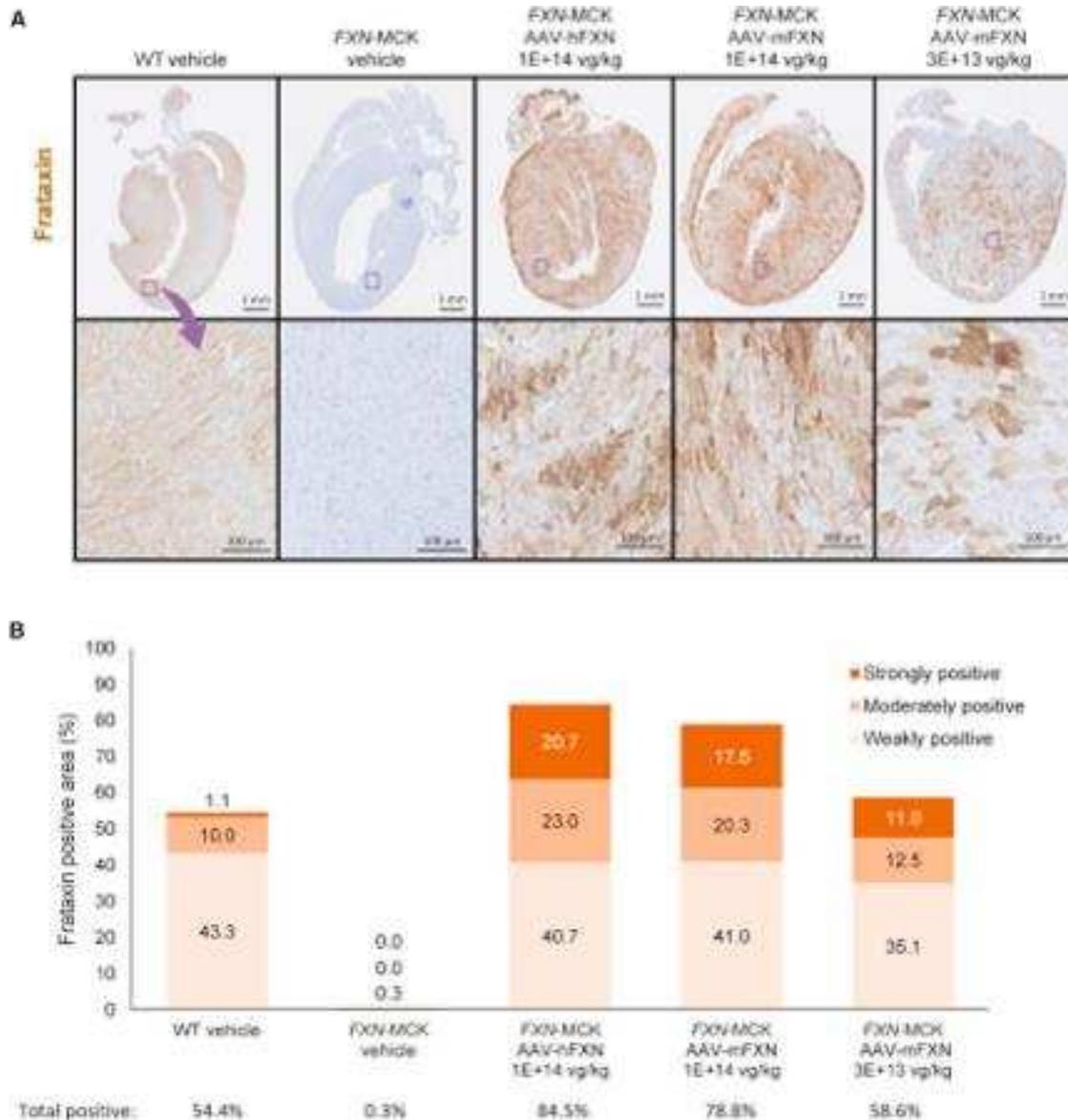


Figure 4. FXN protein distribution in the heart

(A) Heart tissue samples showing FXN expression (IHC) of vehicle-treated WT and FXN-MCK mice and AAV-treated FXN-MCK mice. The images in the bottom row depict the magnification of an area from the sample directly above it (blue box). Scale bars represent 1 mm (top row) and 100 μ m (bottom row). (B) HALO analysis to semiquantify the mean percentage of areas exhibiting FXN stains in strong, moderate, and weak intensity, and total (adding all percentages of strong, moderate, and weak) of all mice. The data below the graph show the mean total percentages of areas exhibiting FXN stains at any intensity in each group, corresponding to the bars above; SDs are provided in Table S7.

potential test article-induced toxicity at 4 and 12 weeks postdose. In the livers of vehicle-treated FXN-MCK mice, centrilobular hepatocytes were pale and vacuolated (3/6). Centrilobular vacuolation was not observed in AAV-hFXN- or AAV-mFXN-treated mice, which is also consistent with the rescue of cardiac deficits or lesions driven by the absence of FXN in these FXN-MCK mice. Microscopic changes in the sciatic nerve, quadriceps muscle, spinal cord, dia-

phragm, DRG, ovary, and testis were not identified in the vehicle-treated FXN-MCK mice. Microscopic changes were not observed in these selected tissues from FXN-MCK mice following the administration of AAV-hFXN or AAV-mFXN at either time point, except that vacuolation in the DRG was noted in 4/5 of the AAV-hFXN-treated FXN-MCK mice and 5/6 of the AAV-mFXN-treated FXN-MCK mice (both at 1E+14 vg/kg), compared with 0/4 of the

Table 1. Histology evaluation for efficacy and safety of AAV treatment in the FXN-MCK mouse model

Group	1	4	7	10	13
Genotype	Wild type	FXN-MCK	FXN-MCK	FXN-MCK	FXN-MCK
Treatment	Vehicle	Vehicle	AAV-mFXN 3E+13 vp/kg	AAV-mFXN 1E+14 vp/kg	AAV-hFXN 1E+14 vp/kg
Males					
No. (animals examined)	2	3	3	3	2
Heart (no. examined)	N = 2	N = 3	N = 3	N = 3	N = 2
Degeneration, cardiomyocyte	(0) ^a	(3)	(0)	(0)	(0)
Minimal	0	1	0	0	0
Moderate	0	2	0	0	0
Thrombus, atrial	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)
Mild	0	1	0	0	0
Fibrosis, myocardial	(0)	(2)	(0)	(0)	(0)
Mild	0	2	0	0	0
Infiltration, mononuclear cell	(2)	(3)	(1)	(1)	(2)
Minimal	2	3	1	1	2
Liver (no. examined)	N = 2	N = 3	N = 3	N = 3	N = 2
Vacuolation, centrilobular	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)
Minimal	0	1	0	0	0
Females					
No. (animals examined)	2	3	3	3	3
Heart (no. examined)	N = 2	N = 2 ^b	N = 3	N = 3	N = 3
Degeneration, cardiomyocyte	(0) ^a	(2)	(0)	(0)	(0)
Minimal	0	1	0	0	0
Mild	0	1	0	0	0
Thrombus, atrial	(0)	(1)	(0)	(1)	(0)
Mild	0	1	0	1	0
Fibrosis, myocardial	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)
Minimal	0	1	0	0	0
Infiltration, mononuclear cell	(0)	(1)	(0)	(1)	(0)
Minimal	0	1	0	1	0
Liver (no. examined)	N = 2	N = 3	N = 3	N = 3	N = 3
Vacuolation, centrilobular	(0)	(2)	(0)	(0)	(0)
Minimal	0	2	0	0	0

Select microscopic findings in the hearts and livers of cohort 1 males and females euthanized 4 weeks postdose.

^aThe numbers in parentheses represent the total counts of animals exhibiting findings.

^bFor animal numbers, see Materials and methods.

lower-dose (3E+13 vp/kg) AAV-mFXN treated FXN-MCK mice and 1/4 of vehicle-treated WT mice (Table S8). This vacuolation was characterized by the presence of multiple clear vacuoles along axons coursing through the ganglia, often surrounding or associated with presumptive Schwann cell nuclei. In general, vacuolation observations in the absence of DRG cell body degeneration should be considered inconclusive. The administration of AAV vector at a dose as low as 3E+13 vp/kg effectively alleviated cardiac phenotypes in the FXN-MCK mice without inducing additional toxicity in the off-target selected tissues.

To evaluate additional pathologies associated with FXN insufficiency, such as iron accumulation and fibrosis, we conducted iron staining and Masson's trichrome staining.²⁸ Abnormal iron accumulation was observed in the hearts of vehicle-treated FXN-MCK mice but not in the hearts of WT or AAV-treated mice (Figure 5A). Consistent with the microscopic evaluation, Masson's trichrome staining revealed cardiac fibrosis in vehicle-treated FXN-MCK mice (6/6), which was nearly absent in FXN-MCK mice that received AAV treatment at 4 weeks postdose (3/17) (Figure 5B). In summary, these results support the role of AAV-mediated FXN expression in the prevention

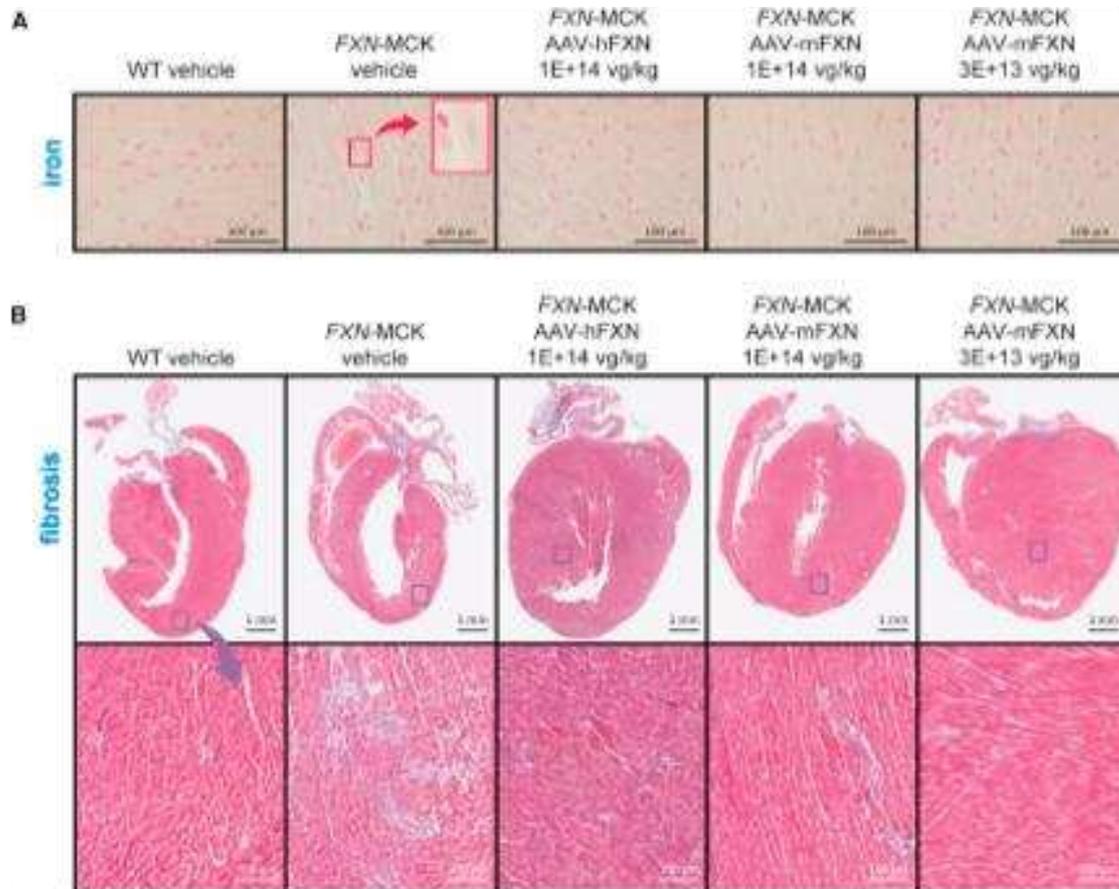


Figure 5. Histological improvement in the heart with the AAV treatment

(A) Heart tissue samples stained with Prussian blue that identifies areas of iron accumulation; scale bars represent 100 μm. Images in the upper right of the second column depict a magnification of an area from the smaller red box (arrow) in the vehicle-treated FXN-MCK mice. (B) Representative Masson trichrome stains for fibrosis of heart tissue samples, with the images in the bottom row depicting the magnification of an area from the sample directly above it. Scale bars represent 1 mm (top row) and 100 μm (bottom row).

or resolution of cardiac pathology without toxic side effects in this mouse model of FRDA.

DISCUSSION

This study assessed the efficacy and safety of AAV vectors containing the FXN gene at doses of 3E+13 or 1E+14 vg/kg administered to conditional knockout mice (FXN-MCK) that model the cardiopathic manifestations of FRDA. The AAV8 serotype was selected based on internal studies, which demonstrated similar cardiac transduction between AAV8 and AAV9 (data not shown). This choice is also supported by relevant publications regarding AAV8 tropism in the heart,^{29,30} as well as a relatively lower level of preexisting immunity against AAV8 in the general population compared with other AAV serotypes.³¹ Two expression vectors were tested, one expressing hFXN (AAV-hFXN) and the other expressing mFXN (AAV-mFXN), to evaluate possible pharmacodynamic differences in species-specific FXN in mice. The amino acid sequence of the co human FXN transgene was confirmed to be identical to the human FXN

consensus sequence. Significant improvements in body weight, heart morphology, cardiac function, and cardiac injury biomarkers, in addition to an extension in the mean of the probability of survival, were observed in FXN-MCK mice that received AAV-based gene therapy compared to vehicle-treated FXN-MCK mice. No differences were observed between the AAV-hFXN and AAV-mFXN vectors in expression levels, correction of cardiac phenotype, prevention of early mortality, or histopathological evaluation. These results support the hypothesis that *de novo* FXN expression in vulnerable organs, such as the heart, can prevent the progression of FRDA-like cardiac deficits and their associated morbidity, even when administering the AAV vector after early aspects of FRDA pathophysiology, such as deficits in ejection fraction, have already manifested.

In addition to the neurological symptoms that develop during FRDA, the majority of patients develop severe cardiomyopathies that eventually progress to heart failure.^{9,32} Given the severity and monogenic nature of the disease and the lack of disease-modifying treatments

available, a gene transfer approach using an AAV vector containing the *FXN* gene was considered a promising therapeutic strategy to treat FRDA.¹² Published studies using AAV constructs containing the *FXN* gene administered in various FRDA animal models with diverse routes of administration resulted in improved outcomes regarding cardiomyopathy, neurodegeneration, and lifespan extension.^{13–15} However, some of these studies that used constructs with a strong constitutive synthetic promoter, such as CAG, a cytomegalovirus early enhancer element fused to the chicken β -actin gene promoter, resulted in what appear to be *FXN* overexpression-associated toxicities.^{17,18} Expression of *FXN* protein by more than 20-fold relative to WT expression levels was shown to impair electron transport chain complexes I and II and alter mitochondrial ultrastructure, leading to cardiomyocyte cell death and cardiac deficits.¹⁷ Huichalaf et al. confirmed that toxic levels of *FXN* following the administration of an AAV9-CAG-*FXN* construct, which affected mouse livers and hearts, caused a reduction in the iron-sulfur cluster biosynthesis by affecting the equilibrium between different complexes involving the cysteine desulfurase and the iron-sulfur cluster scaffold protein.^{18,33}

To avoid potential toxicity associated with AAV constructs that contain strong promoters, we selected a constitutive and relatively lower-strength human PGK promoter to drive *FXN* expression.²⁰ The goal was to transduce more cells using a relatively higher AAV dose, while maintaining *FXN* expression per cell under a certain threshold to avoid toxicity. Tissue transduction as measured by VCN per diploid genome was detected in the hearts of all AAV-treated mice, with a trend toward reflecting dose levels. No significant differences in VCN were observed with an extension of the postdose duration from 4 to 12 weeks, regardless of AAV-h*FXN* dosing at 1E+14 vg/kg ($p = 0.9622$), or AAV-m*FXN* dosing at either 3E+13 ($p = 0.635$) or 1E+14 vg/kg ($p = 0.4955$), suggesting no degradation of the transgene DNA during the additional 8 weeks. PGK was selected as a ubiquitous promoter because *FXN* is a highly conserved mitochondrial protein expressed throughout the body. In the present study, the total percentage of cells exhibiting *FXN* expression as assessed by IHC staining and quantified with HALO image analysis was similar in the lower dose of 3E+13 vg/kg AAV-treated *FXN*-MCK mice, with 58.6% of the tissue displaying positive stain for *FXN* compared to vehicle-treated WT mice at 54.4% in the heart. In addition, there were no significant differences between the lower dose of 3E+13 vg/kg AAV-treated *FXN*-MCK mice and the vehicle-treated WT mice in the *FXN* total protein expression level as measured by ELISA from the homogenized heart tissues at 4 weeks postdose. This suggests that the level and pattern of *FXN* expression following a single AAV-h*FXN* intravenous dose of 3E+13 vg/kg is comparable to that of WT. At the higher dose of 1E+14 vg/kg, consistent with the ELISA results, the total percentage of cells exhibiting *FXN* expression in the heart increased to a similar level at 79% (AAV-m*FXN*) or 85% (AAV-h*FXN*), and the *FXN* expression level reached 21.2-fold compared to WT endogenous level. The strongly positive and moderately positive signals likely contribute to the observed increase in protein expression in the ELISA, showing a 7- to 12-fold increase at 4 weeks postdose. Incorporating regulatory elements, further optimizing the promoter, or identifying and testing the

endogenous *FXN* promoter could yield an expression pattern and level closer to *FXN* expression in WT animals. Although the highest dose in this study reached slightly over a 20-fold *FXN* expression compared to WT levels, no toxicity was observed in the heart for a duration up to 12 weeks postdose, and all of the higher-dose AAV-treated *FXN*-MCK mice survived until the scheduled necropsy at 18 WOA, with no sign of declining health. However, a longer-duration study may be beneficial to rule out possible delayed cardiac toxicity resulting from the chronic overexpression of protein accumulation over time, perhaps in a WT rodent toxicity study. No test article-related toxicities were detected in any selected tissues at both time points, except for the vacuolation observed in the DRG, which was observed only in the higher-dose groups (1E+14 vg/kg). No overt toxicity such as neuronal degeneration was observed in the DRGs of AAV-treated mice. Furthermore, since this effect is not well understood and is subclinical in this study, the severity remains unclear at this time. Conducting a dose-finding study and a 6-month nonhuman primate toxicity study in the future will be beneficial to define the minimum effective dose and provide a comprehensive safety assessment.

Although it is important to avoid expression *FXN* levels that may trigger toxicity, it is also critical to achieve minimally efficacious levels. Although homozygous deletion of *FXN* is embryonically lethal, heterozygous *FXN*-knockout mice are indistinguishable from their WT littermates in physical and behavioral phenotype.³⁴ Human heterozygous carriers with an estimated 50% of normal *FXN* protein expression manifest no clinical symptoms.^{16,35} These observations suggest that *FXN* levels at or above 50% of WT levels can have meaningful therapeutic effects, in particular, in preventing or reversing FRDA-associated cardiomyopathy. A recent study by Munoz-Zuluaga and collaborators³⁶ showed that achieving a minimum therapeutic level of expression may require reaching at least 30% of the healthy human *FXN* level (>17.7 ng/mg), considering that FRDA heterozygotes have *FXN* levels ranging from 30% to 80% of normal. Given that PGK is a lower-strength promoter compared to CAG and other ubiquitous promoters, it is anticipated that a dose level 3–4 times higher would be necessary, likely in the range of 1E+12 vg/kg, to reach approximately 30% of the endogenous *FXN* level. Correspondingly, the PGK promoter-driven *FXN* expression resulted in the improvement of cardiomyopathy and extension of survival in all AAV-treated *FXN*-MCK mice, in contrast to vehicle-treated *FXN*-MCK mice.

The *FXN*-MCK mice showed abnormal cardiac phenotypes, including left ventricular hypertrophy, functional impairment as measured by echocardiogram, and body weight reduction before AAV treatment at 6 WOA, indicating that they were treated at a symptomatic stage, when presumably the *FXN* insufficiency had already caused structural and functional deficits. At the second terminal time point of 18–19 WOA, when all of the vehicle-treated control *FXN*-MCK mice had been previously euthanized, the ejection fraction and left ventricular mass normalized to body weight in the AAV-treated *FXN*-MCK mice were indistinguishable from the vehicle-treated WT control mice. This shows that the AAV-mediated transfer

of the *FXN* gene and *de novo* expression of the protein are capable of not only preventing the progression of cardiac FRDA-associated pathology but also of reversing cardiac deficits of the disease. Relatively lower levels of the cardiac injury biomarker, myosin light chain, detected when comparing AAV-treated *FXN*-MCK to vehicle-treated *FXN*-MCK mice further confirmed the efficacy of the AAV-mFXN and AAV-hFXN vectors. At the cellular level, *FXN* deficiency leads to abnormalities in mitochondrial function, particularly in the regulation of the iron-sulfur cluster that interacts with proteins in the electron transport chain complexes, presumably due to a defect in electron entry and transfer, which ultimately results in the excess generation of reactive oxygen species and reduction of ATP production.⁷ Furthermore, a decrease in the expression level of electron transport chain complexes II has been reported in the *FXN*-MCK mouse model.^{18,37} As a surrogate measure of mitochondrial health, it was shown that immunoreactive levels of complexes I and II from the *FXN*-MCK heart tissues were restored to WT levels following AAV treatment.

FXN deficiency has been shown in previous reports to cause a range of disturbances that are reflected in this *FXN*-MCK mouse model by deficient iron clearance and consequent myocardial tissue damage.^{18,37,38} Iron accumulation and myocardial fibrosis in the hearts of *FXN*-MCK mice were observed in this study. Consistent with the rest of the data, iron accumulation and fibrosis were diminished in the hearts of AAV-treated *FXN*-MCK mice at all dose levels compared to vehicle-treated *FXN*-MCK mice. Histological examination also showed that AAV-treated *FXN*-MCK mice showed an absence or lessening of cardiomyocyte degeneration, myocardial fibrosis, and atrial thrombi that were commonly observed in vehicle-treated *FXN*-MCK mice.^{21,26} It is interesting that improvement of the pale and vacuolated centrilobular hepatocytes in the livers of *FXN*-MCK mice were also alleviated with AAV treatment, possibly due to secondary relief from ischemia resulting from cardiac compromise. A less likely but possible explanation is that the apparent histological improvement in the liver is an artifact of tissue collection that caused cytoplasmic clearance and vacuolation. In general, there was no evidence of an AAV8-*FXN*-induced toxic effect in the heart that would be distinguishable from what was observed in vehicle-treated *FXN*-MCK mice.

In conclusion, progression of the cardiomyopathy-like phenotype that develops in *FXN*-MCK mice was prevented and/or reversed with a single dose of an AAV8-vector containing an *FXN* transgene, as evidenced by an increase in median survival and improved cardiac function and morphology. These results support the potential of this well-tolerated and efficacious AAV8 gene therapy to treat patients with FRDA that develop severe, and often lethal, cardiovascular complications.

MATERIALS AND METHODS

AAV8-PGK-FXN vector construction and production

Both hFXNco and mFXNco coding sequences were subcloned into the proprietary plasmid pAAVAud2, which included the viral ITR²² from

AAV2 and the human 3-PGK promoter (hPGK), an intron, and a polyadenylation signal, both from SV40. The AAV8 vectors used in these studies have been rendered replication defective by virtue of deletion of the rep and cap genes. The whole genome between these ITRs is fully synthetic. The lack of rep gene confirms that current recombinant AAV is unable to replicate alone or with helper viruses. The AAV8-hPGK-hFXNco (AAV-hFXN) and AAV8-hPGK-mFXNco (AAV-mFXN) vectors were produced by cotransfecting Expi-293F cells (Thermo Scientific, catalog no. A14527) with the human or mouse hPGK-FXNco plasmid and a proprietary AAV8 helper plasmid using polyethyleneimine. After 72 h of incubation, the vector was purified from cleared lysates by affinity (POROS GoPure AAV8 Prepacked Column, 5 mL, Thermo Scientific, catalog no. A36647) and anion exchange chromatography (POROS GoPure 50 HQ Ion-Exchange column, Thermo Scientific, catalog no. 4481315) on an AKTA pure high-performance liquid chromatography system, then buffer exchanged into Ringer's lactate solution with 0.01% Pluronic (pH 7.4). All of the vectors were manufactured by Astellas Gene Therapies. Dosing solutions were formulated in Ringer's lactate with 0.01% Pluronic. Lots X01-190226 (AAV-hFXN) and X02-190226 (AAV-mFXN) were produced for each test article. The titer of AAV-hFXN was 2.67E+13 vg/mL and AAV-mFXN was 2.99E+13 vg/mL. The endotoxin of AAV-hFXN was 5.96 endotoxin units (EU)/mL and AAV-mFXN was 3.28 EU/mL (Figure 1).

AAV-hFXN in vitro analysis

Cell lines and culture conditions

C2C12 cells were obtained from the American Type Culture Collection and cultured in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and 1% Anti-Anti. AC16 cells were obtained from Sigma and cultured in F12-DMEM supplemented with 12.5% heat-inactivated FBS and 1% antibiotic-antimycotic. Both cell lines were grown at 37°C in an atmosphere with 5% CO₂.

Quantitative Immunofluorescence

Cells were seeded at 15,000 cells/well in black-walled, clear-bottom tissue culture (TC)-treated 96-well plates; 24 h later, the medium was removed and replaced with fresh medium containing the desired MOI of AAV-hFXN (calculated as vg/cell). After 4 h of incubation with AAV-hFXN-containing media, etoposide was added to a final concentration of 3 μM. At 72 h later, cells were fixed with 4% formaldehyde and analyzed by IF for *FXN* expression. Cells were incubated in Intercept Blocking Buffer (LI-COR 927-70001) for 30 min, then with rabbit anti-*FXN* primary antibody (Abcam 175402) at 2 μg/mL for 2 h, then with Alexa Fluor 488-tagged anti-rabbit secondary antibody (Invitrogen A11008) for 1 h. Plates were read on a SpectraMax M5 with excitation/emission of 490/525 and data were plotted on GraphPad Prism. Hoechst stain (Invitrogen R37605) was added for nuclear visualization in representative imaging. Images were taken on an Olympus IX73.

RNA extraction and droplet digital PCR (ddPCR) analysis

Cells were seeded at 15,000 cells/well in TC-treated 96-well plates; 24 h later, the medium was removed and replaced with fresh medium

containing the desired MOI of AAV-hFXN (calculated as vg/cell). After 4 h of incubation with AAV-hFXN-containing media, etoposide was added to a final concentration of 3 μ M. At 72 h later, cells were harvested in RLT buffer and RNA was extracted using the RNeasy 96 QIAcube HT kit (Qiagen 74171). Following RNA extraction, cDNA was synthesized using the SuperScript IV VILO Kit (Invitrogen 11766500). FXN mRNA was quantified using Bio-Rad's ddPCR system with TaqMan primers and probe specifically designed to recognize coFXN expressed by AAV-hFXN.

In vitro western blot analysis

A total of 200,000 C2C12 cells/well were plated in 6-well TC-treated plates; 24 h later, the medium was removed and replaced with fresh medium containing the desired MOI of AAV-hFXN (calculated as vector genomes per cell). After 4 h of incubation with AAV-hFXN-containing media, etoposide was added to a final concentration of 3 μ M. At 72 h later, cells were harvested in radioimmunoprecipitation assay lysis buffer (Sigma 20-188) containing complete protease inhibitor tablets (Roche 4693124001). Cells were incubated with light agitation at 4°C for 30 min, then spun down at 18,000 \times g for 10 min. The supernatant was harvested and analyzed by bicinchoninic acid (BCA) for total protein content using the Pierce Microplate BCA Protein Assay Kit-Reducing Agent Compatible (Thermo Fisher Scientific 23252). Lithium dodecyl sulfate sample buffer (Invitrogen NP0007) was added to 1 \times final concentration and samples were incubated at 95°C for 10 min. Total protein, 30 μ g, was loaded per well of a NuPAGE 4%–12% Bis-Tris gel (Invitrogen NP0322), as well as one lane of the Odyssey One-Color Protein Molecular Weight Marker (LI-COR 928-40000). The gel was run for 45 min at 180 V in NuPAGE MES SDS Running Buffer supplemented with NuPAGE antioxidant (Invitrogen NP0002 and NP0005, respectively). The separated proteins were then transferred to a polyvinylidene fluoride membrane using the Trans-Blot Turbo instrument from Bio-Rad, blocked in Intercept Blocking Buffer (LI-COR 927-70001) for 1 h under gentle agitation and then incubated with mouse anti-FXN monoclonal antibody (Invitrogen 45-6300) and rabbit anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) monoclonal antibody (Abcam 9485) for 2 h at room temperature under gentle agitation. The membrane was washed and then incubated with IRDye 800CW Donkey anti-mouse and IRDye 680CW goat anti-rabbit secondary antibodies (LI-COR 926-32212 and 926-68071, respectively) for 1 h at room temperature under gentle agitation. Membranes were washed and imaged on the LI-COR Odyssey imaging system.

AAV-hFXN and AAV-mFXN in vivo study

Animal model of FRDA

The FXN-MCK mice (B6.Cg-Fxn^{em1.1Lstey} Fxn^{em2.1Lstey} Tg(Ckmm-cre) 5 Khn/J; The Jackson Laboratory stock no. 029720) contain a Cre-conditional FXN allele floxing exon 2, a global exon 2 deleted knockout FXN allele, and a Cre recombinase transgene driven by muscle creatine kinase promoter (MCK-Cre, B6.FVB(12954)-Tg(Ckmm-cre)5 Khn/J; The Jackson Laboratory stock no. 006475) resulting in a specific ablation of FXN expression in cardiac and skeletal muscle. This mouse model is similar to the one developed by Puccio

and collaborators, in which exon 4 was deleted.²³ The phenotypes in the FXN-MCK mice include progressive weight loss associated with functional cardiac deficits leading to morbidity at 10 \pm 1 WOA. The Jackson Laboratory has characterized the cardiomyopathic phenotypes from this mouse model as decreased heart rate, ejection fraction, and fractional shortening, as well as a significantly increased left ventricular mass distinguishable from nonmutant littermates (<http://www.jax.org/strain/029720>).

Animal study design

Animal procedures and experiments were performed by The Jackson Laboratory in compliance with applicable animal welfare acts and were approved by the local Institutional Animal Care and Use Committee and in accordance with Institutional Biosafety Committee protocols.

We evaluated the efficacy of AAV8-hPGK-hFXNco (AAV-hFXN) and AAV8-hPGK-mFXNco (AAV-mFXN) vectors each administered by a single intravenous dose to rescue survival and cardiomyopathy in an FXN-MCK mouse model of FRDA (Figure 1), using WT mice (CS7BL/6J; The Jackson Laboratory stock no. 000664) and knockout Fxn^{flax/mck}::MCK-Cre conditional knockout mice (FXN-MCK) supplied by The Jackson Laboratory. At 6 WOA, mice were given a single dose of vehicle (Ringer's lactate with 0.01% Pluronic) as control, or AAV-hFXN administered at 1E+14 vg/kg, or AAV-mFXN administered at 1E+14 vg/kg or 3E+13 vg/kg, respectively, via intravenous injection in the tail vein.

Two cohorts were included in this study (Figure 1). Cohort 1 animals were harvested at 10 WOA to provide the first postdose time point at 4 weeks' duration. Two separate groups of animals were designated for bioanalytical analysis (BAN) and histology evaluation in cohort 1. Animals in cohort 2 continued to be monitored beyond 10 WOA until one animal reached a humane endpoint, at which time the entire cohort was euthanized (groups 3, 9, 12, and 15; group 6 terminated at 10 WOA). Since one animal in the AAV-mFXN lower-dose group (3E+13 vg/kg) reached the humane endpoint at 18 WOA, all of the animals in cohort 2 were euthanized for tissue collection at 12 weeks postdosing. There was only one group of animals designated for both BAN and histology evaluation in cohort 2; therefore, tissues were limited. Animal housing facilities were controlled for temperature and humidity, with a 12-h light/dark cycle and free access to water and standard rodent chow (Certified Rodent Diet no. 2014C, Envigo RMS). Safety assessments included clinical observations (BCS),²⁷ body weight, analysis of clinical pathology parameters (including cardiac injury markers), histopathological evaluations, and echocardiography. These comprehensive evaluations aimed to provide a thorough assessment of the safety profile.

Animal health and survival assessments

Physical examination of each animal to ensure that it was "bright, alert, responsive, and healthy," and survival assessments were performed daily, and body weights were recorded weekly. Per protocol, animals reaching the following endpoint criteria (i.e., humane

endpoints), regardless of age or time since dosing, were humanely euthanized and every attempt was made to collect tissues. >20% weight loss from maximum weight, rapid or sustained deterioration in health status resulting in a BCS (The Jackson Laboratory) of ≤ 2 ,²⁷ unresponsive to meaningful stimuli, hunched posture, signs of respiratory distress, or any other condition that interferes with their ability to reach or consume adequate amounts of food or water. In cohort 2, the entire cohort was euthanized for tissue collection once one animal in the cohort reached a humane endpoint.

Cardiac assessments and analyses

Cardiac imaging was performed before dosing, before terminal sacrifice at 9–10 WOA for cohort 1, including both groups for bioanalytical endpoints and histological evaluation and at 18–19 WOA for the lifespan cohort. Animals were anesthetized with up to 5% isoflurane at a flow rate of 0.8–2.0 L/min in oxygen. Ultrasound echocardiography was performed by The Jackson Laboratory Center for Biometrics Core Service using Vevo 770/2100 high-frequency ultrasound with 30- and 40-MHz probes (VisualSonics, Toronto, ON, Canada). B-mode and M-mode images were recorded in parasternal short-axis view for measurement of left ventricular wall thickness and inner diameter. From these direct measurements, diastolic and systolic blood volumes, ejection fraction, fractional shortening, cardiac output, and stroke volume were calculated.

Serum muscle injury biomarkers analyses

Whole blood was collected and processed into plasma for the muscle injury biomarkers panel (cTnI, skeletal troponin, fatty acid binding protein, and myosin light chain) measured using a commercially available kit from MesoScale Discovery (catalog no. K15186C-1) and creatine kinase measured by The Jackson Laboratory Clinical Chemistry Core Service using the Beckman Coulter DxC 700 AU chemistry analyzer.

Tissue collection

Tissues were collected and either flash-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for bioanalytical endpoints or fixed in 10% neutral buffered formalin for histological evaluation. In cohort 1, one group of animals was designated for bioanalytical endpoints, and heart, cerebellum, DRG, and spinal cord tissues were collected for both protein expression and VCN analysis. Another group of animals was designated for histological evaluation, and tissues including heart, liver, sciatic nerve, quadriceps muscle, spinal cord, diaphragm, DRG, and brain were collected and fixed. In cohort 2, heart tissues were collected for only bioanalytical endpoints including protein expression and VCN analysis, and other tissues including liver, sciatic nerve, quadriceps muscle, spinal cord, diaphragm, DRG, and brain were collected for histological evaluation.

Histological tissue staining

Tissues were sectioned to allow visualization of the four chambers of the heart (right/left atria and right/left ventricles). H&E staining was performed and evaluated by a board-certified veterinary

pathologist to allow the assessment of general pathology and the size and shape of cardiac myocytes, whereas IHC analysis evaluated transgene FXN biodistribution, Masson's trichrome staining evaluated fibrosis, and Perls' Prussian blue staining evaluated iron accumulation within cardiac myocytes. Due to the blurry details of the cardiomyocytes, one female H&E-stained heart section was not evaluated in this study. For IHC, anti-FXN antibody (EPR21840, Abcam catalog no. ab219414) was used in conjunction with a 3,3'-diaminobenzidine-based, single chromogenic IHC approach. The images of FXN IHC staining then underwent a quantitative expression assessment using HALO image analysis software (version 3.2.1851.393e, Indica Labs, Albuquerque, New Mexico) to measure the percentage of positive cardiomyocyte (area) and expression levels (signal intensity). The expression levels of positive cardiomyocytes were defined as strong, moderate, and weak, and the whole-heart section was scanned, masked, and analyzed by an anatomic pathologist.

AAV transduction and FXN expression analysis

VCN analysis

Quantification of the vector biodistribution of the test article-specific DNA was performed using a qPCR analytical method. Quantification was performed using a linearized DNA plasmid quantification standard, vector AAVAud2-PGK-FXN, and a primer/probe set designed to specifically detect a coDNA amplicon in this linearized plasmid and in the test article (Figure 1; Table S9). genomic DNA (gDNA) samples were extracted from mouse tissue and run on the QuantStudio 6 Pro Real-Time PCR System to amplify test-article specific DNA and the endogenous housekeeping gene *PCBP2* DNA. Quantification analysis was performed using Thermo Fisher Scientific Design & Analysis Software, version 2.3.3, to determine relative quantification of test article-specific DNA and *PCBP2* DNA in each sample.

ELISA analysis

Quantitation of mFXN and hFXN was performed with tissues from the heart, cerebellum, DRG (cervical), spinal cord, and liver using qualified ELISA kits from Abcam. The quantitated results are expressed as ng/mg of FXN in tissue, expressed as the quotient of each sample's back-calculated concentration and its total protein result as determined by BCA assay. The size of mFXN and hFXN was assessed in heart tissues using western blot with antibodies from Abcam and Invitrogen (Thermo Fisher Scientific). For each analysis, the group and number of animals analyzed is reported in the respective figure legend.

Western blot analysis in mouse heart

mFXN and hFXN levels in mouse tissue lysate were analyzed by western blot using primary antibodies specific for mFXN (Abcam catalog no. ab219414), hFXN (Invitrogen catalog no. 45-6300), and GAPDH (Abcam catalog no. ab8245). The secondary antibodies used were IRDye 800CW donkey anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) (LI-COR, 926-32213) and IRDye 680RD donkey anti-mouse IgG (LI-COR, 926-68072). Images were taken using an Odyssey

DLx imaging system (LI-COR). For the oxidative phosphorylation (OXPHOS) complexes expression analysis, the primary antibodies used were anti-GAPDH (Novus Biologicals, 1D4, NB300-221) at 1:1,000 and anti-OXPHOS (Abcam/Mitosciences, MS601-360, MitoProfile Total antibody cocktail) at 1:500. The secondary antibodies were horseradish peroxidase-conjugated mouse or rabbit from Cell Signaling Technologies at 1:2,000. A total of 30 μ g were loaded into a 4%–12% NuPAGE Bis-Tris Gel, SDS-PAGE (NP0336). Quantification of the bands was performed using the NIH ImageJ software and normalized to the loading control (GAPDH) (WT, N = 4; FXN-MCK, N = 5–6).

Statistical analyses

Survival was compared between treatment groups and age-matched WT controls using chi-square from the Mantel-Cox log rank test. The average body weight per sex and treatment group \pm SD were compared between treatment groups and age-matched WT controls using the Student's t test. Cardiac function parameters, cardiac biomarkers, heart weight normalized for body weight, and skeletal biomarkers were compared between treatment groups and age-matched WT controls with one-way ANOVA at each time point. Symbols indicate p values for significance designated as follows: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, and ****p < 0.0001.

DATA AND CODE AVAILABILITY

The datasets used and/or analyzed during the present study are available from the corresponding author upon reasonable request.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2024.101193>.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by Astellas Gene Therapies. Medical writing support was provided by Laurie LaRusso, MS, ELS, of Chestnut Medical Communications, paid for by Astellas Gene Therapies. Additional editorial support and preparation of artwork files were provided by Joanne Fitz-Gerald, B.Pharm. and Jonathan A.C. Lee, Ph.D. of FourWave Medical Communications, funded by Astellas Gene Therapies.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.C.C., M.R.R., C.D., F.U., B.M., and C.F. designed the study. J.C.C., M.R.R., M.C.S., S.L., P.P., F.B., C.A.J., M.C., H.M., M.W.L., S.H., L.V.N., and C.D. acquired and analyzed the data. H.M. and M.W.L. established the IHC assay, performed IHC, and analyzed the IHC results and the integrative analysis of the study data. C.L. developed and validated the mouse model and platforms for the FXN-MCK mouse. J.C.C., M.R.R., M.C.S., S.L., P.P., M.C., M.W.L., S.H., L.V.N., D.R.L., C.D., E.G.-G., F.U., B.M., and C.F. were involved in the data interpretation. All of the authors contributed to the drafting and critical review of the manuscript for important intellectual content.

DECLARATION OF INTERESTS

J.C.C., M.R.R., M.C.S., S.L., F.B., C.A.J., M.C., B.M., and C.F. are employees of and/or own equity in Astellas Gene Therapies. P.P. and F.U. are former employees of Astellas Gene Therapies. H.M. is an employee of Diverge Translational Science Laboratory. M.W.L. is the founder, owner, and chief executive officer of Diverge Translational Science Laboratory; participated in scientific advisory boards sponsored by Solid Biosciences, Vial, Astellas Gene Therapies, and Ichorion Therapeutics (formerly); received research support from Astellas Gene Therapies, Solid Biosciences, Taysba Gene Therapies, Kate Therapeutics, Prothelia, Ultragenyx, Dynacure, Rocket Pharmaceuticals, Carbon Biosciences, and Voyager Therapeutics; and a paid consultant to Astellas Gene Therapies, Encoded Therapeutics, Lacerta Therapeutics, Affinia Therapeutics, AGADA Biosciences, Modis Therapeutics, Dynacure, BioMarin, Vertex Pharmaceuticals, Locana-bio, Rocket Pharmaceuticals, and Entrada Therapeutics. D.R.L. has received grant funding from Astellas, PTC, Reata, Design, and Novartis.

REFERENCES

- Camptuzano, V., Montermani, L., Molhè, M.D., Pianese, L., Cosso, M., Cavalcanti, F., Morros, E., Redus, F., Dudos, P., Monticelli, A., et al. (1996). Friedrich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 271, 1423–1427. <https://doi.org/10.1126/science.271.5254.1423>.
- Lazaropoulos, M., Dong, Y., Clark, E., Greenley, N.R., Seyer, L.A., Brigatti, K.W., Christie, C., Perlman, S.L., Wilmsot, G.R., Gomez, C.M., et al. (2015). Frataxin levels in peripheral tissue in Friedreich ataxia. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 2, 801–842. <https://doi.org/10.1002/acn3.225>.
- Clark, E., Johnson, J., Dong, Y.N., Mercado-Ayon, E., Warren, N., Zhai, M., McMillan, E., Salovin, A., Lin, H., and Lynch, D.R. (2018). Role of frataxin protein deficiency and metabolic dysfunction in Friedreich ataxia, an autosomal recessive mitochondrial disease. *Neuronal Signal* 2, NS20180060. <https://doi.org/10.1042/NS20180060>.
- Amorino, A., Lane, D.J.R., Huang, M.L.H., and Richardson, D.R. (2014). Fixing frataxin: 'ironing out' the metabolic defect in Friedreich's ataxia. *Br. J. Pharmacol.* 171, 2174–2190. <https://doi.org/10.1111/bjph.12470>.
- Koeppen, A.H. (2011). Friedreich's ataxia: pathology, pathogenesis, and molecular genetics. *J. Neurol. Sci.* 303, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2011.01.010>.
- Ceasac, M., Schmitt, M., Campuzano, V., Reutenauer, L., Moutou, C., Mandel, J.L., and Koerig, M. (1997). Evolution of the Friedreich's ataxia trinucleotide repeat expansion: founder effect and premutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 7452–7457. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.14.7452>.
- Delatycki, M.B., and Bidichandani, S.I. (2019). Friedreich ataxia: pathogenesis and implications for therapies. *Neurobiol. Dis.* 132, 104606. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104606>.
- Harding, A.E. (1981). Friedreich's ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. *Brain* 104, 589–620. <https://doi.org/10.1093/brain/104.3.589>.
- Tsao, A.Y., Paulsen, E.K., Lagerdrot, S.J., Perlman, S.L., Mathews, K.D., Wilmsot, G.R., Ravina, B., Koeppen, A.H., and Lynch, D.R. (2011). Mortality in Friedreich ataxia. *J. Neurol. Sci.* 307, 46–49. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2011.05.021>.
- Koeppen, A.H., Ramirez, R.L., Becker, A.B., Bjork, S.T., Levi, S., Santambrogio, P., Pariona, P.J., Kruger, P.C., Yang, K.X., Feustel, P.J., and Mazurkiewicz, J.E. (2015). The pathogenesis of cardiomyopathy in Friedreich ataxia. *PLoS One* 10, e0116396. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116396>.
- Weidemann, F., Störk, S., Liu, D., Hu, K., Herrmann, S., Ertl, G., and Nömann, M. (2013). Cardiomyopathy of Friedreich ataxia. *J. Neurochem.* 126 (Suppl 1), 88–93. <https://doi.org/10.1111/jnc.12217>.

12. Oceana-Santoro, G., Diaz-Nido, J., and Herranz-Martin, S. (2021). Future prospects of gene therapy for Friedreich's ataxia. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1815. <https://doi.org/10.3390/ijms22041815>
13. Perdomini, M., Belbelia, B., Monastier, L., Reutenauer, L., Messadeg, N., Cartier, N., Crystal, R.G., Aubourg, P., and Puccio, H. (2014). Prevention and reversal of severe mitochondrial cardiomyopathy by gene therapy in a mouse model of Friedreich's ataxia. *Nat. Med.* **20**, 542–547. <https://doi.org/10.1038/nm.3510>
14. Gérard, C., Xiao, X., Filali, M., Corfombe, Z., Arsenault, M., Couet, J., Li, J., Drodet, M.C., Chapdelaine, P., Chikh, A., and Tremblay, J.P. (2014). An AAV9 coding for frataxin clearly improved the symptoms and prolonged the life of Friedreich ataxia mouse models. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **1**, 14044. <https://doi.org/10.1038/mtm.2014.44>
15. Piquet, P., de Montigny, C., Vascarpis, N., Reutenauer, L., Eisenmann, A., and Puccio, H. (2018). Rapid and complete reversal of sensory ataxia by gene therapy in a novel model of Friedreich ataxia. *Mol. Ther.* **26**, 1940–1952. <https://doi.org/10.1016/j.yesme.2018.05.006>
16. Plasteron, H.L., Deutch, E.C., Belmonte, M., Egan, E., Lynch, D.R., and Rusche, J.R. (2013). Development of frataxin gene expression measures for the evaluation of experimental treatments in Friedreich's ataxia. *PLoS One* **8**, e63958. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063958>
17. Belbelia, B., Reutenauer, L., Messadeg, N., Monastier, L., and Puccio, H. (2020). High levels of frataxin overexpression lead to mitochondrial and cardiac toxicity in mouse models. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **19**, 120–138. <https://doi.org/10.1016/j.mtm.2020.08.018>
18. Huichalaf, C., Perfit, T.L., Kuperman, A., Gooch, R., Kovi, R.C., Brennan, K.A., Chen, X., Hirrenkuller-Shanbhappa, D., Ma, T., Asaf, B.T., et al. (2022). *In vivo* overexpression of frataxin causes toxicity mediated by iron-sulfur cluster deficiency. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **24**, 367–378. <https://doi.org/10.1016/j.mtm.2022.02.002>
19. Vannucci, T., Notario Mammano, R., Beccali, O., Bettgezzi, B., Geshovatz, P., Cinque, G., de Riso, A., Quaroni, L., Codazzi, F., and Pastore, A. (2018). Adding a temporal dimension to the study of Friedreich's ataxia: the effect of frataxin overexpression in a human cell model. *Dis. Model. Mech.* **11**, dms032706. <https://doi.org/10.1242/dmm.032706>
20. Qin, J.Y., Zhang, L., Clift, K.L., Hainz, I., Xiang, A.P., Ren, B.Z., and Lahn, B.T. (2010). Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter. *PLoS One* **5**, e10611. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010611>
21. Puccio, H., Simon, D., Cosée, M., Criqui-Filipe, P., Tiziano, F., Melki, J., Hindelang, C., Matyas, R., Rustin, P., and Koenig, M. (2001). Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat. Genet.* **27**, 181–186. <https://doi.org/10.1038/76818>
22. Jing, C., Wang, Y., Lu, Y., Wang, L., Jayandharan, G.R., Alanidhi, G.V., Li, B., Cheng, B., Ma, W., Lentz, T., et al. (2015). The adeno-associated virus genome packaging puzzle. *J. Mol. Genet. Med.* **9**, 175. <https://doi.org/10.4172/1747-0862.1000175>
23. Weng, L., Wang, Q., Yu, S., Yang, X., Lynch, D.R., Mesares, C., and Blair, I.A. (2019). Evaluation of antibodies for western blot analysis of frataxin protein isoforms. *J. Immunol. Methods* **474**, 112629. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.07.001>
24. Weng, L., Labouret, L., Wang, Q., Guo, L., Xu, P., Gottlieb, L., Lynch, D.R., Mesares, C., and Blair, I.A. (2020). Extra-mitochondrial mouse frataxin and its implications for mouse models of Friedreich's ataxia. *Sci. Rep.* **10**, 15788. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72844-w>
25. Schmucker, S., Argentini, M., Carelle-Calmale, N., Martelli, A., and Puccio, H. (2008). The *in vivo* mitochondrial two-step maturation of human frataxin. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 3521–3531. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn244>
26. Payne, R.M. (2011). The heart in Friedreich's ataxia: basic findings and clinical implications. *Prog. Pediatr. Cardiol.* **31**, 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.ppedcard.2011.02.007>
27. Ulkenen-Calbert, M.H., and Felts, C.J. (1999). Body condition scoring: a rapid and accurate method for assessing health status in mice. *Lab. Anim. Sci.* **49**, 319–323.
28. Llorens, J.V., Soejano, S., Calap-Quintana, P., Gonzalez-Cabo, P., and Mohá, M.D. (2019). The role of iron in Friedreich's ataxia: insights from studies in human tissues and cellular and animal models. *Front. Neurosci.* **13**, 75. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00075>
29. Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G., and Robinowitz, J.E. (2008). Analysis of AAV serotypes 1–9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol. Ther.* **16**, 1073–1080. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.76>
30. Zhang, H., Zhan, Q., Huang, B., Wang, Y., and Wang, X. (2022). AAV-mediated gene therapy: Advancing cardiovascular disease treatment. *Front. Cardiovasc. Med.* **9**, 952755. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.952755>
31. Routin, S., Montelhet, V., Veron, P., Leborgne, C., Benveniste, O., Montus, M.F., and Mazurier, C. (2010). Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors. *Hum. Gene Ther.* **21**, 704–712. <https://doi.org/10.1089/hum.2009.182>
32. Jensen, M.K., and Bundgaard, H. (2012). Cardiomyopathy in Friedreich ataxia: exemplifying the challenges faced by cardiologists in the management of rare diseases. *Circulation* **125**, 1591–1593. <https://doi.org/10.1161/ATRICTIONAHA.112.095364>
33. Schmucker, S., Martelli, A., Colín, F., Page, A., Wattenhofer-Dorazi, M., Reutenauer, L., and Puccio, H. (2011). Mammalian frataxin: an essential function for cellular viability through an interaction with a preformed ISCU/NFS1/ISD11 iron-sulfur assembly complex. *PLoS One* **6**, e16199. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016199>
34. Gossé, M., Puccio, H., Ganarmuler, A., Koutnikova, H., Dietrich, A., LeMeun, M., Paschbeck, K., Dollé, P., and Koenig, M. (2000). Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 1219–1226. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.8.1219>
35. Campuzano, V., Montemini, L., Lutz, Y., Corva, L., Hindelang, C., Jiralerspong, S., Trotter, Y., Kish, S.J., Faocheux, B., Trouillas, P., et al. (1997). Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 1771–1780. <https://doi.org/10.1093/hmg/6.11.1771>
36. Munoz-Zuluaga, C., Gerta, M., Yost-Rido, M., Gresco, A., Gorman, N., Chen, A., Koenig, V., Rosenberg, J.R., De, B.P., Karninsky, S.M., et al. (2023). Identification of safe and effective intravenous dose of AAVrh.10hFXN to treat the cardiac manifestations of Friedreich's ataxia. *Hum. Gene Ther.* **34**, 605–615. <https://doi.org/10.1089/hum.2023.026>
37. Whitnall, M., Suryo Rahmanto, Y., Sutak, R., Xu, X., Becker, F.M., Michael, M.R., Ponce, P., and Richardson, D.R. (2008). The MCK mouse heart model of Friedreich's ataxia: alterations in iron-regulated proteins and cardiac hypertrophy are limited by iron chelation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 9757–9762. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804261105>
38. Hanson, E., Sheldon, M., Pacheco, B., Alkubeysi, M., and Razzada, Y. (2019). Heart disease in Friedreich's ataxia. *World J. Cardiol.* **11**, 1–12. <https://doi.org/10.4330/wjc.v11.i1.1>

Supplemental information

**AAV8 gene therapy reverses cardiac pathology
and prevents early mortality in a mouse
model of Friedreich's ataxia**

Joshua C. Chang, Molly R. Ryan, Marie C. Stark, Su Liu, Pravinkumar Purushothaman, Fria Bolan, Caitlin A. Johnson, Mark Champe, Hui Meng, Michael W. Lawlor, Sarah Halawani, Lucie V. Ngaba, David R. Lynch, Crystal Davis, Elena Gonzalo-Gil, Cathleen Lutz, Fabrizia Urbinati, Bala Medicherla, and Carlos Fonck

Table S1. AAV test article information. All vectors were manufactured by Astellas Gene Therapies. Dosing solutions were formulated in Ringer's Lactate with 0.01% Pluronic acid.

Name	Abbreviation	Titer (vg/ml)	Endotoxin (EU/ml)
AAV8-hPGK-mFXNco	AAV-mFXN	2.99E+13	3.28
AAV8-hPGK-hFXNco	AAV-hFXN	2.67E+13	5.96
Ringer's Lactate with 0.01% Pluronic	Vehicle or Control	NA	NA

AAV8, adeno-associated virus serotype 8; hPGK, human phosphoglycerate kinase promoter; hFXNco, human frataxin coding sequence; mFXNco, mouse frataxin coding sequence; NA, not applicable.

Table S2. FXN-MCK mouse study of AAV8 FXN gene therapy experimental design.

AAV8-hPGK-hFXNco (AAV-hFXN) or AAV8-hPGK-mFXNco (AAV-mFXN) was administered as a single intravenous dose at 3E+13 vg/kg or 1E+14 vg/kg in FXN-MCK mice or WT mice (Jackson Lab: 000664) as controls. Two cohorts were included in this study. In Cohort 1, animals were dosed at 6 WOA and harvested at 10 WOA to provide the first post-dose timepoint at 4 weeks duration. Animals in Cohort 2 were dosed at 6 WOA and monitored beyond 10 WOA until one animal reaches humane endpoint at which point the entire cohort was to be euthanized. Since one animal in the AAV-mFXN lower-dose group (3E+13 vg/kg) reached the humane endpoint at 18 WOA, all animals in Cohort 2 were euthanized for tissue collection at 12 weeks postdosing.

Group	N (gender)	Genotype	Treatment	Dose Level (vg/kg)	*Cohort-Analysis	Duration
1	2F/2M	WT	Vehicle	NA	1st - Histology	4 weeks
2	2F/2M	WT	Vehicle	NA	1st - Bioanalytical	4 weeks
3	2F/2M	WT	Vehicle	NA	2nd - Bioanalytical	12 weeks
4	3F/3M	FXN-MCK	Vehicle	NA	1st - Histology	**4 weeks
5	3F/3M	FXN-MCK	Vehicle	NA	1st - Bioanalytical	**4 weeks
6	3F/3M	FXN-MCK	Vehicle	NA	2nd - Bioanalytical	**12 weeks
7	3F/3M	FXN-MCK	AAV-hFXN	1E+14	1st - Histology	4 weeks
8	3F/3M	FXN-MCK	AAV-hFXN	1E+14	1st - Bioanalytical	4 weeks
9	3F/3M	FXN-MCK	AAV-hFXN	1E+14	2nd - Bioanalytical	12 weeks
10	3F/3M	FXN-MCK	AAV-mFXN	1E+14	1st - Histology	4 weeks
11	3F/3M	FXN-MCK	AAV-mFXN	1E+14	1st - Bioanalytical	4 weeks
12	3F/3M	FXN-MCK	AAV-mFXN	1E+14	2nd - Bioanalytical	12 weeks
13	3F/2M [#]	FXN-MCK	AAV-mFXN	3E+13	1st - Histology	4 weeks
14	2F/3M [#]	FXN-MCK	AAV-mFXN	3E+13	1st - Bioanalytical	4 weeks
15	2F/2M [#]	FXN-MCK	AAV-mFXN	3E+13	2nd - Bioanalytical	12 weeks

[#] Animal numbers depended on the availability.

* Animals in Cohort 2 were monitored beyond 10 WOA, these animals were euthanized once one animal in the cohort reached humane endpoint and the entire cohort (group 3, 9, 12, and 15) was euthanized for tissue collection. This happened at 18 WOA, therefore, 12 weeks post dose for the lifespan groups.

** Groups 4–6: untreated FXN-MCK mice have a mean survival of 10+/-1 WOA.

F, female; M, male; NA, not applicable; WOA, weeks of age; WT, wild-type.

Table S3. Mean heart VCN and frataxin protein expression by group in WT and FXN-MCK mice dosed with vehicle, AAV-mFXN, or AAV-hFXN.

	WT Vehicle		FXN-MCK Vehicle		FXN-MCK AAV-hFXN 1E+14 vg/kg		FXN-MCK AAV-mFXN 1E14 vg/kg		FXN-MCK AAV-mFXN 3E13 vg/kg		
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
VCN											
Age 10 weeks	BLOQ	NA	BLOQ	NA	1.5	0.78	1.12	0.72	0.77	0.87	
Age 18 weeks	BLOQ	NA	BLOQ	NA	1.29	0.43	1.58	0.76	0.3	0.1	
Frataxin protein											
Age 10 weeks	169.71	10.77	0.00	0.00	1220.02	145.63	1992.20	1039.82	504.71	325.83	
Age 18 weeks	165.50	27.72	0.00	0.00	2997.96	818.58	3549.12	931.91	840.12	177.58	

BLOQ, below limit of quantitation; VCN, vector copy number; WT, wild-type.

Table S4. Supporting data for vector copy number in heart. (A) VCN of each individual animal. (B) VCN data represented as average per treatment group +/-standard deviation.

A.

Sample #	Mouse ID	Mouse Genotype	Gender	Group	Treatment Vector	Dose (yg/kg)	Cohort	Duration (weeks)	Age (weeks)	Terminated	**RQ Threshold	VCN/dg
1	5	WT	F	2	Vehicle	N/A	First	4	9-10		0	0
2	6	WT	F	2	Vehicle	N/A	First	4	9-10		0	0
3	7	WT	M	2	Vehicle	N/A	First	4	9-10		0	0
35	8	WT	M	2	Vehicle	N/A	First	4	9-10		0	0
24	9	WT	F	3	Vehicle	N/A	Second	12	18-19		0	0
25	10	WT	F	3	Vehicle	N/A	Second	12	18-19		0	0
26	11	WT	M	3	Vehicle	N/A	Second	12	18-19		0	0
27	12	WT	M	3	Vehicle	N/A	Second	12	18-19		0	0
4	16	<i>FXN-MCK</i>	F	5	Vehicle	N/A	First	4	9-10		0	0
5	17	<i>FXN-MCK</i>	F	5	Vehicle	N/A	First	4	9-10		0	0
6	18	<i>FXN-MCK</i>	F	5	Vehicle	N/A	First	4	9-10		0	0
13	50	<i>FXN-MCK</i>	M	5	Vehicle	N/A	First	4	9-10		0.000213	0.000426
14	51	<i>FXN-MCK</i>	M	5	Vehicle	N/A	First	4	9-10		0	0
15	52	<i>FXN-MCK</i>	M	5	Vehicle	N/A	First	4	9-10		0	0
48	20	<i>FXN-MCK</i>	F	6	Vehicle	N/A	Second	^a 4	^a 9-10		0	0
49	19	<i>FXN-MCK</i>	F	6	Vehicle	N/A	Second	^a 4	^a 9-10		0	0
50	21	<i>FXN-MCK</i>	F	6	Vehicle	N/A	Second	^a 4	^a 9-10		0	0
51	53	<i>FXN-MCK</i>	M	6	Vehicle	N/A	Second	^a 4	^a 9-10		0	0
52	54	<i>FXN-MCK</i>	M	6	Vehicle	N/A	Second	^a 4	^a 9-10		0	0
53	55	<i>FXN-MCK</i>	M	6	Vehicle	N/A	Second	^a 4	^a 9-10		0	0
7	26	<i>FXN-MCK</i>	F	8	AAV-hFXN	1E+14	First	4	9-10		0.508	1.017
8	27	<i>FXN-MCK</i>	F	8	AAV-hFXN	1E+14	First	4	9-10		0.612	1.223
16	59	<i>FXN-MCK</i>	M	8	AAV-hFXN	1E+14	First	4	9-10		0.762	1.525
17	61	<i>FXN-MCK</i>	M	8	AAV-hFXN	1E+14	First	4	9-10		0.488	0.976
36	25	<i>FXN-MCK</i>	F	8	AAV-hFXN	1E+14	First	4	9-10		0.603	1.206
38	60	<i>FXN-MCK</i>	M	8	AAV-hFXN	1E+14	First	4	9-10		1.521	3.042
28	28	<i>FXN-MCK</i>	F	9	AAV-hFXN	1E+14	Second	12	18-19		0.361	0.721
29	29	<i>FXN-MCK</i>	F	9	AAV-hFXN	1E+14	Second	12	18-19		0.674	1.348
30	30	<i>FXN-MCK</i>	F	9	AAV-hFXN	1E+14	Second	12	18-19		0.409	0.819
40	62	<i>FXN-MCK</i>	M	9	AAV-hFXN	1E+14	Second	12	18-19		0.799	1.599
41	63	<i>FXN-MCK</i>	M	9	AAV-hFXN	1E+14	Second	12	18-19		0.899	1.797

42	64	<i>FXN</i> -MCK M	9	AAV-hFXN 1E+14	Second	12	18-19	0.717	1.433
9	34	<i>FXN</i> -MCK F	11	AAV-mFXN 1E+14	First	4	9-10	0.212	0.424
10	35	<i>FXN</i> -MCK F	11	AAV-mFXN 1E+14	First	4	9-10	0.567	1.134
18	68	<i>FXN</i> -MCK M	11	AAV-mFXN 1E+14	First	4	9-10	0.892	1.785
19	69	<i>FXN</i> -MCK M	11	AAV-mFXN 1E+14	First	4	9-10	0.654	1.308
20	70	<i>FXN</i> -MCK M	11	AAV-mFXN 1E+14	First	4	9-10	0.071	0.143
37	36	<i>FXN</i> -MCK F	11	AAV-mFXN 1E+14	First	4	9-10	0.965	1.931
31	37	<i>FXN</i> -MCK F	12	AAV-mFXN 1E+14	Second	12	18-19	0.367	0.733
32	38	<i>FXN</i> -MCK F	12	AAV-mFXN 1E+14	Second	12	18-19	0.398	0.796
33	39	<i>FXN</i> -MCK F	12	AAV-mFXN 1E+14	Second	12	18-19	0.649	1.299
43	71	<i>FXN</i> -MCK M	12	AAV-mFXN 1E+14	Second	12	18-19	1.215	2.430
44	72	<i>FXN</i> -MCK M	12	AAV-mFXN 1E+14	Second	12	18-19	0.904	1.809
45	73	<i>FXN</i> -MCK M	12	AAV-mFXN 1E+14	Second	12	18-19	1.213	2.427
11	43	<i>FXN</i> -MCK F	14	AAV-mFXN 3E+13	First	4	9-10	0.081	0.161
12	44	<i>FXN</i> -MCK F	14	AAV-mFXN 3E+13	First	4	9-10	0.170	0.340
21	76	<i>FXN</i> -MCK M	14	AAV-mFXN 3E+13	First	4	9-10	1.151	2.302
22	77	<i>FXN</i> -MCK M	14	AAV-mFXN 3E+13	First	4	9-10	0.254	0.509
23	78	<i>FXN</i> -MCK M	14	AAV-mFXN 3E+13	First	4	9-10	0.256	0.513
34	45	<i>FXN</i> -MCK F	15	AAV-mFXN 3E+13	Second	12	18-19	0.150	0.300
39	46	<i>FXN</i> -MCK F	15	AAV-mFXN 3E+13	Second	12	18-19	0.186	0.371
46	79	<i>FXN</i> -MCK M	15	AAV-mFXN 3E+13	Second	12	18-19	0.080	0.160
47	80	<i>FXN</i> -MCK M	15	AAV-mFXN 3E+13	Second	12	18-19	0.178	0.357

B.

Mouse	Treatment Vector	Dose (vg/kg)	Cohort	Duration (weeks)	Age (weeks)	Mean (VCN/dg)	SD
WT	Vehicle	0	First	4	9-10	*	NA
WT	Vehicle	0	Second	12	18-19	*	NA
<i>FXN</i> -MCK	Vehicle	0	First	4	9-10	*	NA
<i>FXN</i> -MCK	Vehicle	0	Second	*4	*9-10	*	NA
<i>FXN</i> -MCK	AAV-hFXN	1E+14	First	4	9-10	1.50	0.78
<i>FXN</i> -MCK	AAV-hFXN	1E+14	Second	12	18-19	1.29	0.43
<i>FXN</i> -MCK	AAV-mFXN	1E+14	First	4	9-10	1.12	0.72
<i>FXN</i> -MCK	AAV-mFXN	1E+14	Second	12	18-19	1.58	0.76
<i>FXN</i> -MCK	AAV-mFXN	3E+13	First	4	9-10	0.77	0.87
<i>FXN</i> -MCK	AAV-mFXN	3E+13	Second	12	18-19	0.30	0.10

*Below limit of quantitation (BLOQ)

**relative quantification (RQ)

#Animals were assigned for Cohort 2 12 weeks duration but, due to mortality, were terminated early at 4 weeks post dose. VCN, vector copy number.

Table S5. Mean frataxin protein expression level by ELISA per treatment group and mean fold changes compared to WT in heart, cerebellum, cervical dorsal root ganglion, liver, and spinal cord.

Protein: Mean FXN (ng/mg)								
Tissue	4 weeks post dose (9-10 WOA)				12 weeks post dose (18-19 WOA)			
	WT	AAV-mFXN 3E+13 vg/kg	AAV-mFXN 1E+14 vg/kg	AAV-hFXN 1E+14 vg/kg	WT	AAV-mFXN 3E+13 vg/kg	AAV-mFXN 1E+14 vg/kg	AAV-hFXN 1E+14 vg/kg
Heart	169.71	504.71	1992.20	1220.02	165.50	840.12	3549.12	2997.96
Cerebellum	N/A				41.16	34.55	64.40	72.50
DRG- Cervical	N/A				20.20	367.03	2045.71	1081.41
Liver	N/A				70.26	6193.24	6434.45	1144.61
Spinal Cord	N/A				36.40	78.94	348.65	191.43

Mean FXN Fold Increase Over WT						
Tissue	4 weeks post dose (9-10 WOA)			12 weeks post dose (18-19 WOA)		
	AAV-mFXN 3E+13 vg/kg	AAV-mFXN 1E+14 vg/kg	AAV-hFXN 1E+14 vg/kg	AAV-mFXN 3E+13 vg/kg	AAV-mFXN 1E+14 vg/kg	AAV-hFXN 1E+14 vg/kg
Heart	2.97	11.74	7.19	5.08 (1.7-fold increase over 4-week level)	21.44 (1.8-fold increase over 4-week level)	18.11 (2.5-fold increase over 4-week level)
Cerebellum	N/A			0.84	1.56	1.76
DRG- Cervical	N/A			18.17	101.26	53.53
Liver	N/A			88.14	91.57	16.29
Spinal Cord	N/A			2.17	9.58	5.26

DRG, dorsal root ganglion; FXN, frataxin; WOA, weeks of age; WT, wild-type.

Table S6. ELISA data of frataxin protein expression level of each individual animal.

Sample ID	Tissue / Serum	Genotype	Gender	Vector / Control	Dose -Conc (vg/kg)	Protein Concentration (mg/mL)	Adjusted Back-calculated Concentration (ng/mL)	Tissue (ng/mg)
5	Heart	WT	F	Vehicle	0	3.39	624.34	184.4
6	Heart	WT	F	Vehicle	0	3.94	671.24	170.49
7	Heart	WT	M	Vehicle	0	3.97	653.4	164.43
8	Heart	WT	M	Vehicle	0	3.81	608.33	159.53
9	Heart	WT	F	Vehicle	0	3.7	661.2	178.46
10	Heart	WT	F	Vehicle	0	3.89	737.96	189.62
11	Heart	WT	M	Vehicle	0	4.04	678.29	167.81
12	Heart	WT	M	Vehicle	0	4.36	549.56	126.13
16	Heart	<i>FXN-MCK</i>	F	Vehicle	0	3.78	<LLOQ	N/A
17	Heart	<i>FXN-MCK</i>	F	Vehicle	0	3.74	<LLOQ	N/A
18	Heart	<i>FXN-MCK</i>	F	Vehicle	0	3.97	<LLOQ	N/A
50	Heart	<i>FXN-MCK</i>	M	Vehicle	0	3.58	<LLOQ	N/A
51	Heart	<i>FXN-MCK</i>	M	Vehicle	0	4.53	<LLOQ	N/A
52	Heart	<i>FXN-MCK</i>	M	Vehicle	0	4.07	<LLOQ	N/A
19	Heart	<i>FXN-MCK</i>	F	Vehicle	0	3.47	<LLOQ	N/A
20	Heart	<i>FXN-MCK</i>	F	Vehicle	0	3.7	<LLOQ	N/A
21	Heart	<i>FXN-MCK</i>	F	Vehicle	0	3.52	<LLOQ	N/A
53	Heart	<i>FXN-MCK</i>	M	Vehicle	0	4.05	<LLOQ	N/A
54	Heart	<i>FXN-MCK</i>	M	Vehicle	0	3.88	<LLOQ	N/A
55	Heart	<i>FXN-MCK</i>	M	Vehicle	0	4.23	<LLOQ	N/A
34	Heart	<i>FXN-MCK</i>	F	AAV-mFXN	1E+14	3.56	1666.59	468.06
35	Heart	<i>FXN-MCK</i>	F	AAV-mFXN	1E+14	4.15	6105.9	1471.74
36	Heart	<i>FXN-MCK</i>	F	AAV-mFXN	1E+14	4.02	5655.84	1405.77
68	Heart	<i>FXN-MCK</i>	M	AAV-mFXN	1E+14	4.05	11434.32	2821.64
69	Heart	<i>FXN-MCK</i>	M	AAV-mFXN	1E+14	4.03	10537.28	2612.41
70	Heart	<i>FXN-MCK</i>	M	AAV-mFXN	1E+14	4.39	13935.6	3173.59
37	Heart	<i>FXN-MCK</i>	F	AAV-mFXN	1E+14	3.85	10670.52	2770.93
38	Heart	<i>FXN-MCK</i>	F	AAV-mFXN	1E+14	4.44	12273.64	2761.25
39	Heart	<i>FXN-MCK</i>	F	AAV-mFXN	1E+14	4.39	23036.04	5250.06
71	Heart	<i>FXN-MCK</i>	M	AAV-mFXN	1E+14	4.22	16264.7	3851.05
72	Heart	<i>FXN-MCK</i>	M	AAV-mFXN	1E+14	4.96	15855.6	3196.17
73	Heart	<i>FXN-MCK</i>	M	AAV-mFXN	1E+14	4.63	16040.32	3465.25
43	Heart	<i>FXN-MCK</i>	F	AAV-mFXN	3E+13	3.98	1040.53	261.51
44	Heart	<i>FXN-MCK</i>	F	AAV-mFXN	3E+13	4.04	2491.43	616.76
76	Heart	<i>FXN-MCK</i>	M	AAV-mFXN	3E+13	4.57	583.52	127.66
77	Heart	<i>FXN-MCK</i>	M	AAV-mFXN	3E+13	4.06	2262.68	556.71
78	Heart	<i>FXN-MCK</i>	M	AAV-mFXN	3E+13	4.05	3888.15	960.89
45	Heart	<i>FXN-MCK</i>	F	AAV-mFXN	3E+13	4.15	4418.38	1064.55
46	Heart	<i>FXN-MCK</i>	F	AAV-mFXN	3E+13	3.9	3208.76	822.14
79	Heart	<i>FXN-MCK</i>	M	AAV-mFXN	3E+13	4.17	2631.95	630.58
80	Heart	<i>FXN-MCK</i>	M	AAV-mFXN	3E+13	4.32	3639.96	843.23
25	Heart	<i>FXN-MCK</i>	F	AAV-hFXN	1E+14	4.34	5663.45	1303.67
26	Heart	<i>FXN-MCK</i>	F	AAV-hFXN	1E+14	3.86	3922.2	1016.72
27	Heart	<i>FXN-MCK</i>	F	AAV-hFXN	1E+14	3.75	4114.22	1098.08
59	Heart	<i>FXN-MCK</i>	M	AAV-hFXN	1E+14	4.38	6160.97	1405.77
60	Heart	<i>FXN-MCK</i>	M	AAV-hFXN	1E+14	4.12	4904.45	1189.73
61	Heart	<i>FXN-MCK</i>	M	AAV-hFXN	1E+14	4.68	6111.3	1306.16
28	Heart	<i>FXN-MCK</i>	F	AAV-hFXN	1E+14	3.81	9718.56	2551.44

29	Heart	<i>FXN</i> -MCK	F	AAV-hFXN	1E+14	4.28	16263.84	3798.25
30	Heart	<i>FXN</i> -MCK	F	AAV-hFXN	1E+14	3.88	9098.28	2342.4
62	Heart	<i>FXN</i> -MCK	M	AAV-hFXN	1E+14	4.36	17170.17	3936.93
63	Heart	<i>FXN</i> -MCK	M	AAV-hFXN	1E+14	4.31	14580.54	3385.09
64	Heart	<i>FXN</i> -MCK	M	AAV-hFXN	1E+14	4.3	8482.4	1973.63

F, female; M, male; <LLOQ: below lower limit of quantitation; WT, wild-type.

Table S7. Percentage of heart exhibiting stains indicative of frataxin expression for all mice and as average with standard deviation of HALO analysis.

Slide #	Tissue Area Analyzed (μm^2)	% FXN Positive Tissue				% Negative Tissue
		Total	Weak	Moderate	Strong	
WT Vehicle						
1	16538607	52.16266	47.34106	4.527714	0.293884	47.83732
2	19996052	70.2064	50.37495	17.25669	2.574757	29.79329
3	25608146	27.49894	23.01789	4.266257	0.214792	72.50103
4	23115310	67.83754	52.59359	13.77306	1.47089	32.16233
Ave/total	21314528.8	54.42638	43.33187	9.955931	1.138581	45.57349
SD	3925377.761	19.65603976	13.71271698	6.575446393	1.11653182	19.65613781
FXN-MCK Vehicle						
13	18899632	0.379275	0.351192	0.018007	0.010076	99.62018
14	22341912	0.348194	0.331693	0.010778	0.005724	99.65174
15	29554020	0.401395	0.392404	0.004985	0.004005	99.59842
47	24438710	0.179217	0.167845	0.006613	0.004759	99.82078
48	22089222	0.407929	0.308552	0.076949	0.022429	99.59142
49	26521326	0.357773	0.350127	0.00623	0.001415	99.64122
Ave/total	23974137	0.345631	0.316969	0.020594	0.008068	99.65396
SD	3736489.212	0.084817687	0.078085486	0.028015589	0.007582672	0.085009623
FXN-MCK AAV-hFXN 1E+14 vg/kg						
22	21401050	82.24025	44.99888	24.55339	12.68798	17.75975
23	18871522	86.44708	42.05393	22.48321	21.90993	13.55292
24	20709736	84.27337	40.83887	21.81927	21.61523	15.72658
56	26418390	83.51098	43.00318	23.12432	17.38348	16.48902
57	17395786	87.72466	35.75322	24.88925	27.08219	12.27535
58	23454546	82.5931	37.76303	21.21017	23.6199	17.40684
Ave/total	21375171.7	84.46491	40.73518	23.01327	20.71645	15.53507
SD	3234349.858	2.188808935	3.427139213	1.473863758	5.03487611	2.18879482
FXN-MCK AAV-mFXN 1E+14 vg/kg						
31	17065734	71.63458	44.33105	17.56946	9.73407	28.36538
32	19479206	88.02242	39.9261	24.56103	23.53529	11.97758
33	20848654	83.42033	37.31495	23.83585	22.26953	16.57933
65	22835798	65.62169	46.10941	13.47552	6.036762	34.37831
66	22196432	85.08664	40.31975	22.54639	22.2205	14.91336
67	12344399	78.98282	37.76109	20.01538	21.20635	21.01714
Ave/total	19128370.5	78.79475	40.96039	20.33394	17.50042	21.20518
SD	3911961.645	8.613555343	3.546228546	4.23812113	7.575074726	8.613585386
FXN-MCK AAV-mFXN 3E+13 vg/kg						
40	24200508	57.03153	38.26676	11.72333	7.041434	42.96847
41	24798270	67.06777	34.67212	15.44456	16.95108	32.93192
42	22688016	60.06673	33.94276	13.27333	12.85065	39.93324
75	27251412	49.95041	30.78004	9.703705	9.466665	50.0494
74	24173632	59.06556	37.88222	12.24801	8.935328	40.93441
Ave/total	24622367.6	58.6364	35.10878	12.47859	11.04903	41.36349
SD	1663119.162	6.151017239	3.08030322	2.106665688	3.908723246	6.151058663

SD, standard deviation; WT, wild-type.

Table S8. Histology evaluation for efficacy and safety of AAV treatment in the FXN-MCK mouse model. Select microscopic findings in the brain and dorsal root ganglia of Cohort 2* males and females euthanized 12 weeks post dose.

Summary: Incidence								
Tissue	Male				Female			
	WT Vehicle	AAV-hFXN 1E+14 vg/kg	AAV-mFXN 1E+14 vg/kg	AAV-mFXN 3E+13 vg/kg	WT Vehicle	AAV-hFXN 1E+14 vg/kg	AAV-mFXN 1E+14 vg/kg	AAV-mFXN 3E+13 vg/kg
No. of animals	2	3	3	2	2	2	3	2
Brain								
Examined	2	3	3	2	2	2	3	2
No visible lesions	2	3	3	2	2	2	3	2
DRG								
Examined	2	3	3	2	2	2	3	2
No visible lesions	1	0	0	2	2	1	1	2
Vacuolation								
Minimal	0	1	3	0	0	1	2	0
Mild	1	1	0	0	0	0	0	0
Moderate	0	1	0	0	0	0	0	0

*Note: Two cohorts were included in this study. In Cohort 1, animals were dosed at 6 WOA and harvested at 10 WOA to provide the first post-dose timepoint at 4 weeks duration. Animals in Cohort 2 (Life-span) were dosed at 6 WOA and monitored beyond 10 WOA until one animal reached the humane endpoint, at which point the entire cohort was to be euthanized. Since one animal in the AAV-mFXN lower-dose group (3E+13 vg/kg) reached the humane endpoint at 18 WOA, all animals in Cohort 2 were euthanized for tissue collection at 12 weeks post dosing.

AAV, adeno-associated virus, DRG, dorsal root ganglia; WOA, weeks of age; WT, wild-type.

Table S9. Primers for VCN. PL0007_SV40 primer/probe set was used to detect and quantify vector-specific DNA, which was normalized to housekeeping gene *PCBP2* detected by PCBP2 IVS 13 primer/probe set.

Primer	Sequence	T _m	% GC	Lot #
PL0007_SV40_FWD	5'-TGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTT-3'	62	32	411936604
PL0008_SV40_REV	5'-GAACCTGAAACATAAAAATGAATGCA-3'	61	32	411936605
PL0010_SV40_PRB MGB	5'-FAM-TGCAGCTTATAATGGTTACA-MGB-3'	58	35	7283416-2
PCBP2 IVS 13 - FWD Set 1	5'-TTGTGTCTCCAGTCTGCTTG-3'	62	50	277019468
PCBP2 IVS 13 - REV Set 1	5'-AGGTGGTGGTGGTGGTA-3'	62.1	59	277019469
PCBP2 IVS 13 - PRB Set 1	5'-YakYel/CCCTCTCCT/ZEN/GGCTCTAAATGTTGTGT/IABkFQ-3'	67.6	50	277019472

VCN, vector copy number.

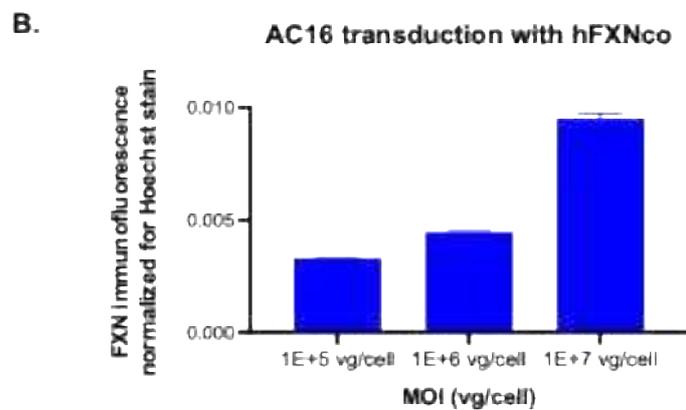
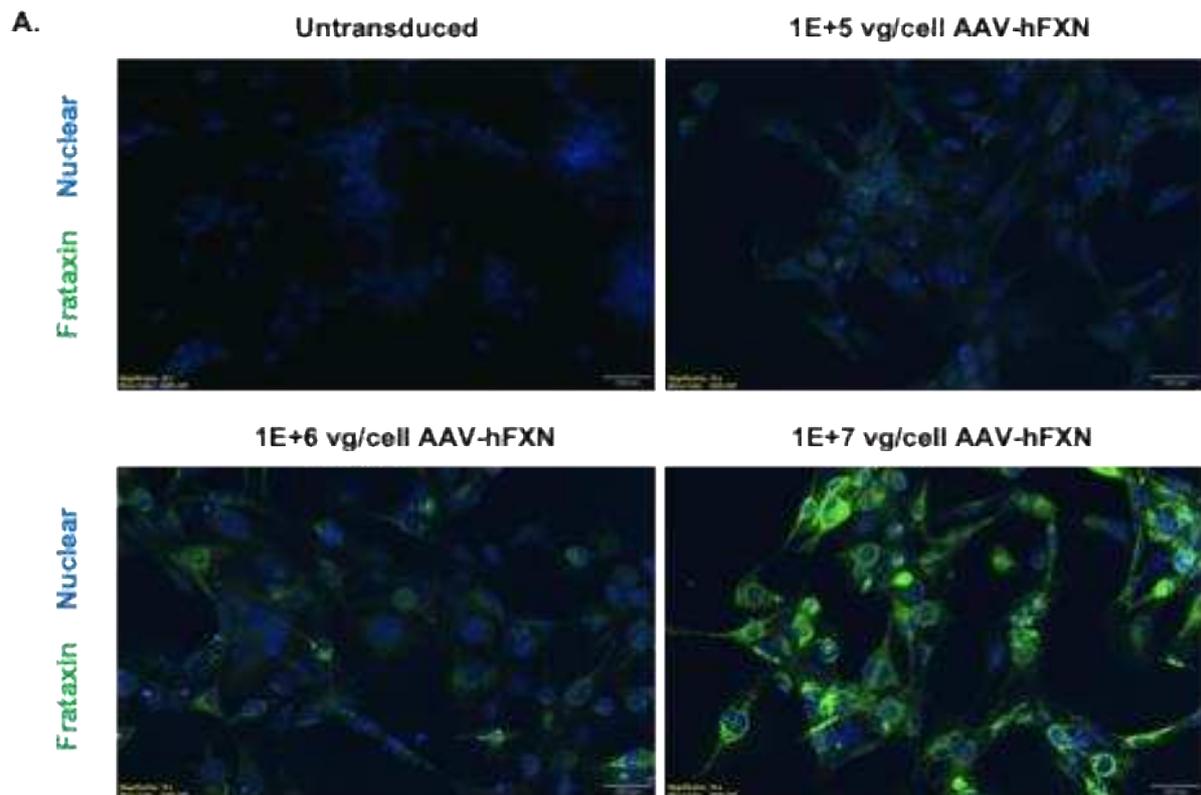


Figure S1. AAV construct in vitro testing. Representative images of AC16 cells transduced with 1E+5, 1E+6, or 1E+7 vg/cell AAV-hFXN and an untransduced negative control; scale bars = 100 μ m (A). Quantification of frataxin immunofluorescence at each MOI was plotted using GraphPad Prism (B). IF Images were taken on an Odyssey IX73 fluorescence microscope. IF, immunofluorescence; MOI, multiplicity of infection.

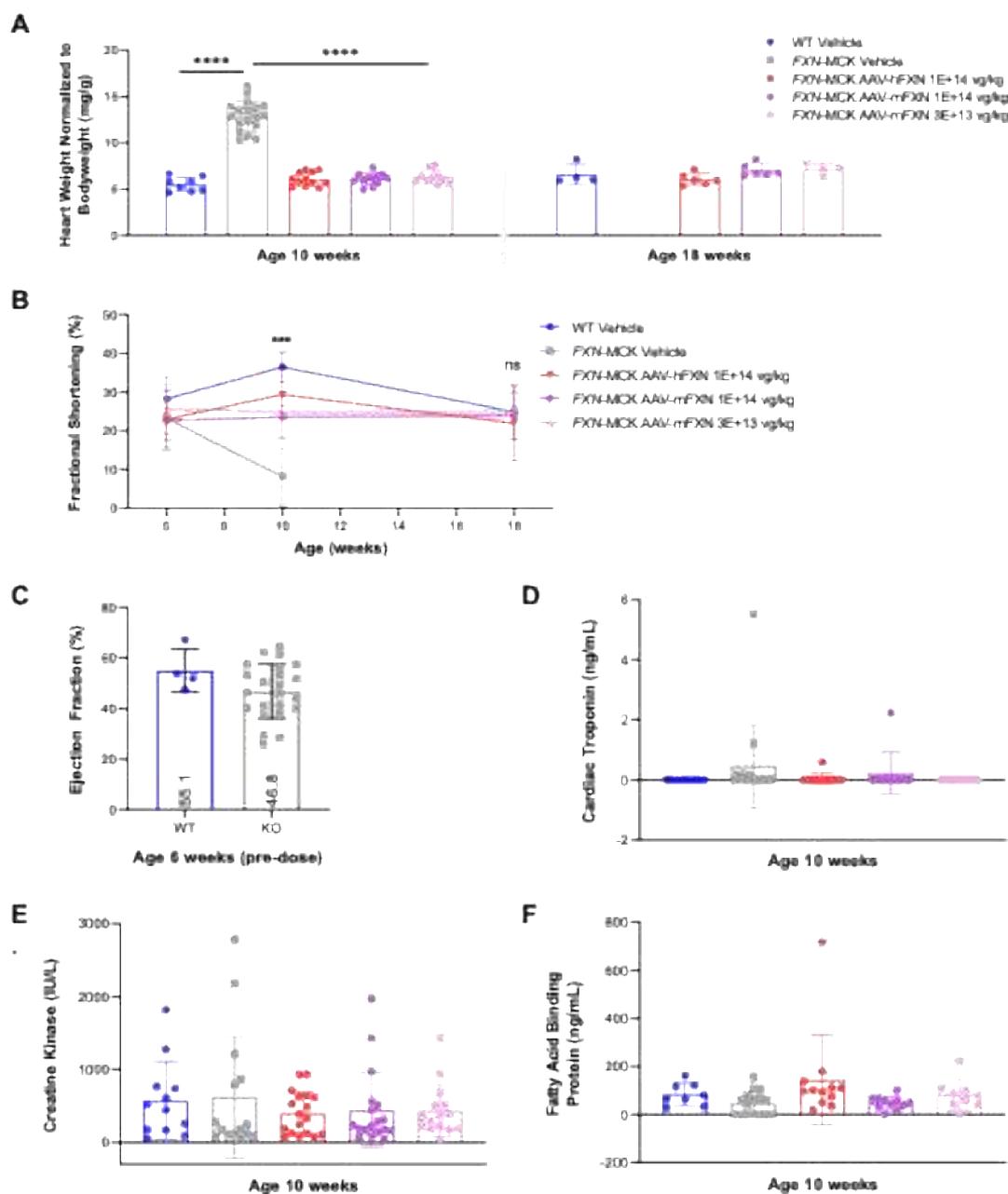


Figure S2. Additional cardiac imaging and biomarker parameters.

(A) Wet heart tissue weight and terminal body weight were recorded at necropsy for all animals; data represented as tissue weight normalized to terminal body weight average per treatment group \pm standard deviation. Data analyzed by one-way ANOVA comparing to vehicle control at each timepoint. Normalized heart weights for vehicle-treated *FXN*-MCK mice were significantly higher compared to sex-matched WT control mice and compared to all AAV-treated *FXN*-MCK mice ($P < 0.0001$) at 9-10 WOA. No significant differences in normalized heart weights between AAV-treated *FXN*-MCK mice and age-matched WT controls at 18-19 WOA. (B) Data

represented as average % fractional shortening per treatment group +/-standard deviation at each timepoint. Data were analyzed using two-way ANOVA at each timepoint between treatment groups and age-matched control. Significant reductions in fractional shortening were noted in vehicle-treated *FXN*-MCK mice at 9-10 WOA compared to all other treatment groups (compared to WT control $P < 0.0001$ and AAV-hFXN, compared to AAV-mFXN higher and lower dose $P < 0.001$). No significant differences were observed between WT controls and AAV-treated *FXN*-MCK mice at final timepoint 18-19 WOA. (C) Data represented as average % ejection fraction +/-standard deviation at 5-6 WOA of untreated WT mice and *FXN*-MCK mice. (D-F) Creatine kinase levels (muscle isoform, MM-CK) were measured using Beckman Coulter AU680 chemistry analyzer. Cardiac troponin I and fatty acid binding protein 3 were measured using Meso Scale Discovery Mouse Muscle Injury Panel (Meso Scale Discovery, cat no: K15186C-1) as per manufacturer's instructions.

*** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

ANOVA, analysis of variance; WOA, weeks of age; WT, wild type.

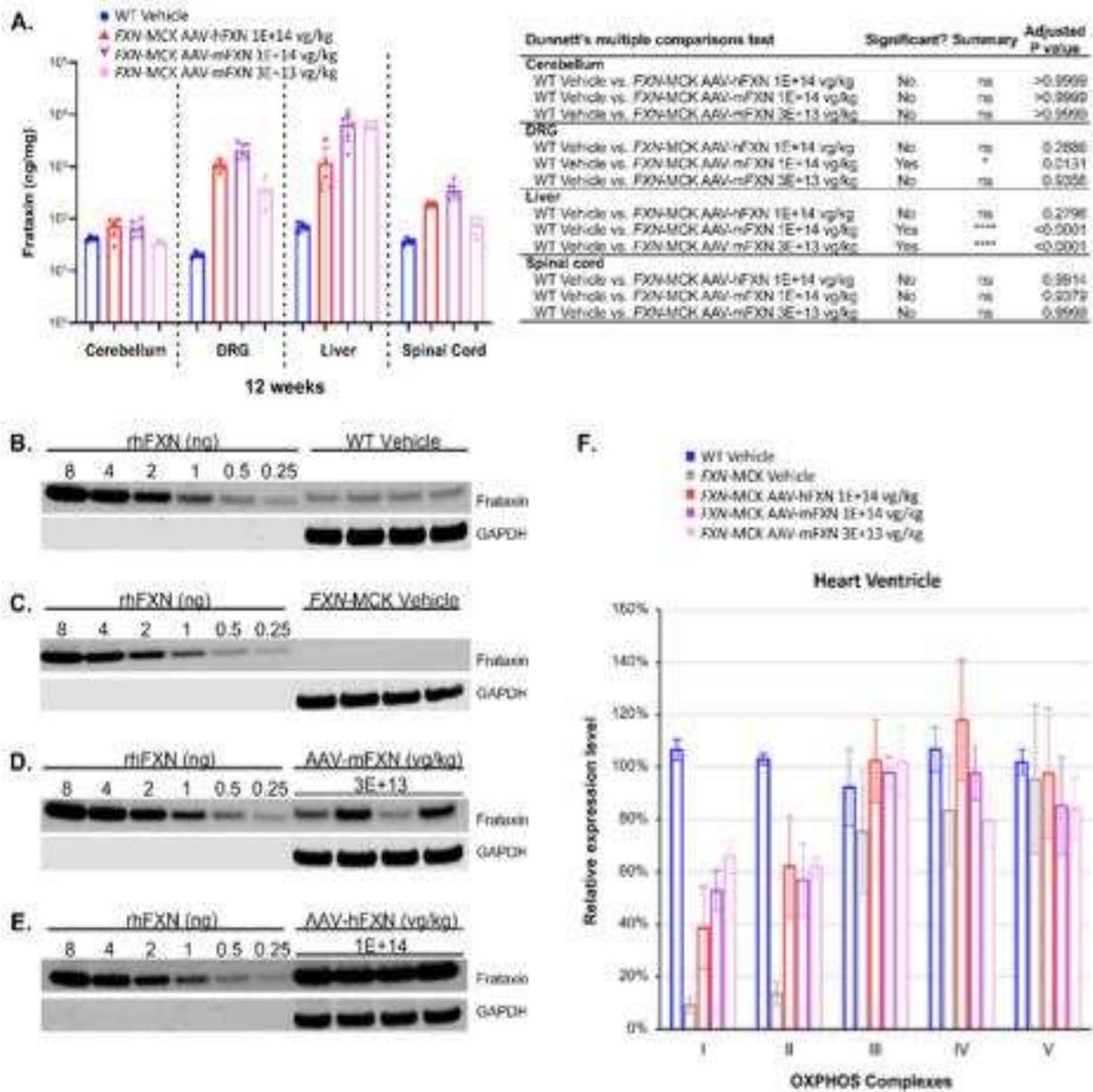


Figure S3. Supporting data for frataxin expression. (A) Frataxin expression in selected tissues and western blot of frataxin. Data are mean \pm standard deviations, where each point represents an individual animal. The table indicates statistically significant differences with P value for each AAV-treated group compared to the WT group. (B) Mouse frataxin in the heart of vehicle-treated WT mice at 4 weeks post dose. (C) Mouse frataxin in the heart of vehicle-treated *FXN-MCK* mice at 4 weeks post dose. (D) Mouse frataxin in the heart of *FXN-MCK* mice dosed with AAV-mFXN at 3E+13 vg/kg at 4 weeks post dose. (E) Human frataxin in the heart of *FXN-MCK* mice dosed with AAV-hFXN at 1E+14 vg/kg at 4 weeks post dose. (F) Semi-quantification was performed to compare the expression levels of OXPHOS complexes I to V in heart ventricle. The quantification of the bands was performed using the NIH ImageJ software and normalized to the loading control (GAPDH) (WT, N=4; *FXN-MCK*, N=5-6). DRG, dorsal root ganglion; ns, not significant; rhFXN, recombinant human frataxin; WT, wild-type.