

Exon skipping: la via italiana

Exon skipping: una terapia genica per la DMD

Nell'ottica di una terapia genica per la DMD, l'ostacolo più importante è rappresentato dalle enormi dimensioni del gene della distrofia: 2.4 Mb, il più grande gene contenuto nel nostro DNA. Ciò fa sì che la normale sostituzione genica non si presenta come un approccio possibile. Nel corso degli anni, sono state ideate diverse strategie alternative tra cui quella dell'**exon skipping**, una tecnica che mira ad eliminare il "danno molecolare" modificando direttamente l'RNA messaggero che codifica per la distrofina.

La terapia basata sull'exon skipping non può essere considerata una cura vera e propria, piuttosto un modo per convertire una mutazione di tipo Duchenne in una di tipo Becker, ovvero un modo per ridurre la gravità della distrofia. Quando una mutazione cambia il "**reading frame**", ovvero lo schema di lettura, del gene della distrofina non vi è più la produzione della proteina funzionale e ciò causa l'insorgenza della DMD. Il corretto schema di lettura del gene può essere ristabilito eliminando direttamente uno o più esoni corrispondenti alla regione in cui è presente la mutazione.

Questo processo di eliminazione viene effettuato usando dei corti frammenti di RNA, chiamati **antisenso**, che si appaiano in zone specifiche della molecola precursore dell'**RNA messaggero** (in particolare alle giunzioni di splicing degli esoni). Alla fine di questa "operazione molecolare", la distrofina prodotta sarà più corta del normale ma, se il pezzo eliminato non corrisponde ad una regione cruciale, potrà ancora svolgere la sua funzione muscolare. La versione corta della proteina presenta dei difetti, ma sempre meglio mal funzionante che non funzionante. Insomma, il concetto è di limitare i danni agendo direttamente sulla causa.

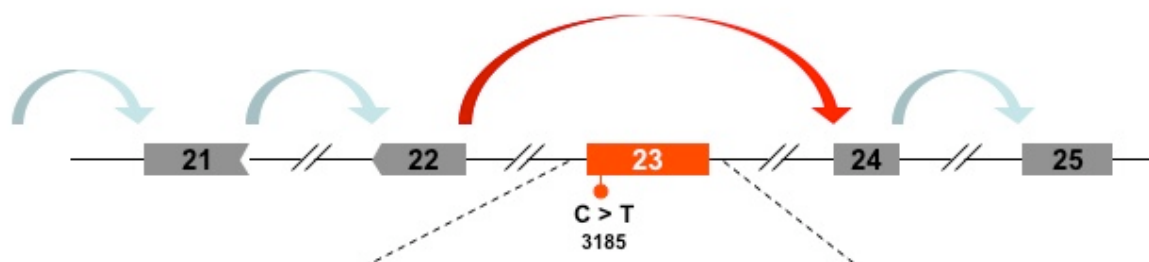
L'exon skipping rappresenta una delle tecniche più promettenti del momento e sulla quale si stanno impegnando diversi gruppi di ricerca nel mondo.

Il team di Irene Bozzoni e Parent Project: un'unione contro la distrofia

Il gruppo di ricerca guidato da **Irene Bozzoni**, professoressa all'**Università di Roma "La Sapienza"**, è da anni schierato in prima linea nella battaglia contro la distrofia muscolare. I suoi studi sono basati sull'utilizzo di vettori costruiti *ad hoc* per veicolare, all'interno delle cellule muscolari, le molecole di RNA necessarie per l'exon skipping. I primi importanti risultati sono arrivati nel 2002 e dal 2003 e, da allora, i progetti di Irene Bozzoni sono sostenuti da Parent Project onlus. In particolare, dal 2003 ad oggi, l'associazione ha finanziato la fase pre-clinica della ricerca, ovvero la sperimentazione effettuata sul **topo mdx** come modello animale per la distrofia di Duchenne, e intende fornire, per il prossimo futuro, i finanziamenti per le prove tossicologiche e la sperimentazione clinica sull'uomo dell'exon skipping.

I primi risultati del gruppo di ricerca romano, pubblicati nel 2002 sulla rivista scientifica *PNAS (Proceeding of the National Academy of Sciences)*, sono stati ottenuti su colture di cellule muscolari (i **mioblasti**) di un paziente DMD con una delezione degli esoni 48, 49 e 50. Questa delezione causa un cambiamento dello schema di lettura del gene della distrofina, cambiamento che può essere annullato con l'eliminazione dell'esone 51. Gli esperimenti sono stati condotti introducendo nei mioblasti dei vettori retrovirali contenenti geni codificanti per molecole di RNA antisenso in grado di riconoscere le giunzioni di splicing specifiche ed eliminare l'esone 51. Questa strategia ha dato risultati molto interessanti: innanzitutto è stato dimostrato che le molecole di RNA introdotte nelle cellule sono stabili e la loro azione è continuativa nel tempo, secondo si è ottenuto il ripristino della produzione di distrofina che, anche se più corta, è funzionante.

Visto l'efficacia della strategia messa a punto, lo studio è stato esteso al modello animale per la DMD: il topo mdx. Questo topo ha una mutazione puntiforme "non senso", ovvero la formazione di un codone di stop, nell'esone 23 del gene per la distrofina, con la conseguente produzione di una distrofina non funzionale. In questo caso come "navetta" di trasporto per i geni codificanti gli RNA antisenso sono stati utilizzati **vettori Virali Adeno Associati (AAV)**: un tipo di vettore virale che, non essendo patogenico, viene molto usato in terapia genica. La somministrazione locale (per via intramuscolare) o in tutto il corpo (per via sistemica, mediante la vena nella coda del topo) ha dato risultati molto positivi che sono stati pubblicati su *PNAS* nel 2006. Le analisi molecolari hanno dimostrato la presenza di alti livelli di RNA antisenso nei muscoli del topo, i quali hanno indotto l'exon skipping dell'esone 23 determinando la produzione di distrofina e, soprattutto, il recupero della funzionalità muscolare. L'introduzione di virus AAV per via sistemica ha permesso di ottenere un'efficiente trasporto dei geni terapeutici in tutti i distretti muscolari, inclusi il cuore e il diaframma che rappresentano i tessuti più importanti per il trattamento terapeutico dei malati DMD.



La possibilità di usare il sistema AAV è un punto molto importante, questi vettori hanno il vantaggio di non provocare infiammazione e di inserirsi efficientemente all'interno di cellule muscolari, dove il DNA virale viene mantenuto in forma stabile.

Successivi esperimenti effettuati sui topi mdx hanno mostrato l'effetto a lungo termine degli RNA antisenso: 18 mesi dopo l'iniezione sistemica l'RNA antisenso continua ad essere espresso e ad indurre sintesi di distrofina in tutti i distretti muscolari inclusi il cuore e il diaframma.

La prolungata espressione di distrofina e i livelli di proteina prodotti sono inoltre tali da preservare questi muscoli dalla forte degenerazione tipica dei topi mdx e da migliorarne le capacità funzionali. Altri tipi di esperimenti di terapia genica hanno dimostrato che, nelle scimmie, i geni veicolati mediante AAV rimangono stabili e attivi per oltre 6 anni.

Ad oggi, nel mondo, sono in corso ben 28 trial clinici con AAV con dati positivi circa la loro efficacia. La strategia di exon skipping mediante l'utilizzo di AAV è quindi assai promettente ai fini di una possibile terapia genica della DMD nell'uomo. L'aspetto più entusiasmante di questa tecnica è proprio l'efficacia a lungo termine. A differenza degli approcci terapeutici di exon skipping basati sugli AON (oligonucleotidi antisenso) portati avanti dagli olandesi e dagli inglesi, per i quali la somministrazione delle molecole antisenso avviene quotidianamente per tutto il periodo di trattamento, la strategia italiana lascia sperare per una possibile terapia basata su di un trattamento che viene ripetuto solo ogni 5-6 anni.

L'impegno di **Parent Project** è ora quello di seguire le fasi che potrebbero portare ad un trial clinico di exon skipping anche in Italia. Il percorso per accedere alla sperimentazione sull'uomo prevede ulteriori fasi di sperimentazione pre-clinica per ottimizzare l'efficacia dei vettori virali e delle molecole da utilizzare per ottenere lo skipping di diversi esoni della distrofina e per verificare la tossicità di questo trattamento. In particolare, il gruppo di ricerca guidato da Irene Bozzoni sta ora testando diverse molecole di RNA antisenso per lo skipping dell'esone 51 e analizzando la possibilità di ideare nuove molecole per lo skipping di esoni diversi. L'obiettivo finale è di progettare una terapia che possa essere utilizzata per diversi profili genetici e quindi per un numero

maggiore di pazienti DMD.

Parallelamente a quest'attività prettamente sperimentale se ne affiancherà un'altra mirata alla preparazione della documentazione necessaria da sottoporre alle autorità competenti. Questa fase prevede la preparazione di protocolli da sottoporre all'Istituto Superiore di Sanità, e successivamente all'EMEA (Agenzia Europea per la Valutazione dei Medicinali), per la richiesta di autorizzazione alla sperimentazione clinica e per la registrazione del farmaco.

I costi per un percorso pre-clinico del genere sono molto elevati: circa 1 milione e 500mila Euro. Una cifra che rappresenta la possibilità di avviare un nuovo trial clinico italiano per la Duchenne, che andrà ad affiancare le altre sperimentazioni in via di sviluppo nel resto del mondo.

L'obiettivo di Parent Project con la Campagna "**Rompere il silenzio**" di febbraio 2008 è stata proprio quello di raccogliere fondi per sostenere quest'importante progetto.

Francesca Ceradini