

XV Conferenza Internazionale di Parent Project onlus.

Dalla ricerca di base nuove strategie per combattere la distrofia muscolare di Duchenne e Becker.

Come ormai da tradizione, la Conferenza Internazionale si è aperta con una sessione interamente dedicata alla ricerca di base. I ricercatori hanno illustrato approcci molto innovativi volti a “correggere” le mutazioni che causano la Duchenne, quali la terapia genica, l’editing genomico e molecole antisense di ultima generazione. Ma anche nuove strategie alternative, rispetto al panorama attuale degli studi clinici in corso, per combattere il processo di infiammazione e di degenerazione muscolare tipico delle distrofie muscolari di Duchenne e Becker. Tutti approcci che sono attualmente ancora in fase di studio in laboratorio, ma alcuni dei quali sono già pronti per entrare nella fase di sperimentazione clinica entro il 2017.

di Francesca Ceradini

Il primo focus è stato dedicato all’**editing genomico**, la tanto rivoluzionaria quanto dibattuta tecnica di ingegneria genetica che permette di effettuare un “taglia e cuci” del DNA con una potenzialità, precisione e versatilità mai viste finora. Ad aprire la conferenza è stata **Annemieke Aartsma-Rus, dell’Università di Leiden in Olanda**, la quale ha illustrato lo stato dell’arte di questa interessante tematica. Sono diversi i gruppi di ricerca che lavorano sull’editing genomico, in particolare con la tecnica Crispr-Cas9, nell’ambito della Duchenne. Attualmente, gli esperimenti sono stati tutti effettuati in laboratorio su topi modello per la distrofia muscolare (mdx) o su cellule prelevate da pazienti DMD. Il sistema Crispr si basa su un enzima deputato al taglio del DNA (Cas9) e una molecola guida (RNA) che indica il punto preciso in cui tagliare, lo scopo è di correggere le mutazioni presenti sul gene della distrofina e indurre così la produzione della proteina essenziale al funzionamento dei muscoli scheletrici. Per effettuare questa “operazione genetica” il sistema Crispr viene veicolato nell’organismo mediante un vettore virale, nello specifico un adenovirus-associato AAV, lo stesso tipo di vettore generalmente utilizzato anche negli approcci di terapia genica. La maggior parte degli studi sono stati focalizzati sulla rimozione delle mutazioni presenti sul gene della distrofina mediante l’eliminazione di uno o più esoni, un approccio che richiama la strategia dell’exon skipping ideato per ristabilire la corretta lettura del gene. In realtà le differenze sono sostanziali: mentre il classico exon skipping agisce sulla molecola che veicola l’informazione genetica nella cellula (RNA messaggero), Crispr agisce sul DNA, ovvero modifica direttamente il codice genetico. Inoltre il sistema Crispr assicura un alto grado di precisione e la possibilità di andare ad operare “chirurgicamente” su diversi livelli: dall’eliminazione di una piccola mutazione, all’eliminazione di uno o più esoni. Per questo motivo ci si aspetta che la correzione con l’editing genomico, oltre ad essere definitiva, abbia un’efficienza superiore a quella dell’exon skipping. I risultati ottenuti finora dai vari studi hanno dimostrato, in generale, una buona produzione di distrofina sia nelle cellule muscolari umane, coltivate in laboratorio, sia nel tessuto muscolare (compreso il cuore) dei topi. In questi ultimi è stata inoltre osservata una netta diminuzione dell’infiammazione e degenerazione del tessuto muscolare, e un significativo incremento della forza muscolare. Nonostante i risultati promettenti, e l’entusiasmo dell’intera comunità scientifica per le potenzialità dell’editing genomico, questa tecnica è ancora ai suoi albori e molti aspetti tecnici devono ancora essere messi a punto. Per poter passare ad un’eventuale sperimentazione clinica bisognerà aspettare ancora un po’.

Sempre rimanendo in tema di “correzioni” per indurre la produzione di distrofina, al fine di preservare la funzionalità dei muscoli, si è passati alla classica strategia di exon skipping. Ne ha parlato **Wendy Erler di Wave Life Sciences**, un’azienda focalizzata sugli studi preclinici con oligonucleotidi antisenso di nuova generazione, chiamati **stereopuri**, nell’ambito delle malattie rare. La biotech americana ha puntato allo sviluppo di diverse forme di nuove molecole antisenso che tra loro condividono la stessa composizione chimica ma che differiscono l’una dall’altra per struttura tridimensionale e quindi per proprietà fisiche e chimiche. Giocando sulle diverse caratteristiche i ricercatori sono riusciti a ideare delle molecole che risultano molto più efficaci nell’indurre l’exon skipping rispetto agli antisenso utilizzati fino ad oggi nei diversi studi clinici. L’antisenso di punta è ideato per lo **skipping dell’esone 51** (ovvero per il 13% della popolazione Duchenne) per cui Wave Life Sciences ha disegnato tre diverse forme. Gli esperimenti condotti su cellule prelevate da pazienti DMD, e coltivate in laboratorio, hanno mostrato un’altissima efficienza di skipping per tutti e tre le molecole, dose dipendente e incredibilmente superiore (fino a 25 volte) rispetto a quella dimostrata con eteplirsen (molecola attualmente autorizzata negli Stati Uniti dalla FDA con il nome di Exondys51) e drisapersen (per cui è stato invece al momento interrotto lo sviluppo clinico). Anche la conseguente produzione di distrofina raggiunge tassi notevoli: le cellule trattate con gli antisenso producono dal 50% al 100% di proteina rispetto a cellule sane, e già dopo 6 giorni dal trattamento. Inoltre, esperimenti condotti su topi modello per la distrofia muscolare hanno dimostrato che la distrofina viene prodotta efficientemente nei vari distretti muscolari, compresi il diaframma e il cuore. Questi risultati molto promettenti aprono le porte all’avvio di una sperimentazione clinica di fase 1 per valutare la sicurezza della strategia, partendo da una prima molecola. Wendy Erler ha annunciato che il trial è pianificato per la seconda metà del 2017 e che Wave Life Sciences sta disegnando il protocollo in collaborazione con la comunità Duchenne. Lo studio clinico includerà sia pazienti deambulanti che non, inoltre potrà partecipare anche chi è già stato trattato con strategie di exon skipping. Il trial sarà condotto sia negli Stati Uniti che in Europa, ma i particolari non sono ancora stati definiti.

Da sempre, uno degli obiettivi più ambiziosi della comunità scientifica è di riuscire a compensare la mancanza di distrofina, tipico della Duchenne, veicolando all’interno del tessuto muscolare il gene sano della distrofina. Purtroppo le grandi dimensioni del gene (quello della distrofina è il più grande gene che abbiamo), e le limitate dimensioni dei vettori utilizzati per la terapia genica, rendono l’impresa impossibile. Per questo motivo, da qualche anno diversi gruppi di ricerca stanno puntando a strategie di **terapia genica** basate sull’utilizzo di una forma di dimensioni ridotte, ma funzionale, del gene della distrofina - la cosiddetta **microdistrofina** - che possa essere contenuta in un vettore virale. Ed è in questa direzione che va la ricerca di **Solid Bioscience**, una biotech fondata da genitori di bambini e ragazzi DMD, focalizzata esclusivamente nell’identificare terapie per la distrofia muscolare di Duchenne. L’approccio, denominato **SGT-001**, è stato presentato in conferenza da **Carl Morris**. Si tratta di studi in fase pre-clinica per testare l’effetto della microdistrofina “incapsulata” in un vettore virale adenovirus-associato (AAV), ideato per avere come bersaglio il tessuto muscolare, e somministrata per via sistemica (ovvero nella circolazione sanguigna) in topi mdx e cani modello per la distrofia muscolare. Gli esperimenti condotti finora hanno mostrato che una singola somministrazione di AAV-microdistrofina per via sistemica determina un’espressione a lungo termine della microdistrofina (che permane fino a 16 mesi nei cani) non solo nei muscoli, ma anche nel diaframma e nel cuore. La produzione di microdistrofina si osserva, inoltre, nel 70% delle fibre muscolari e ciò è associato a un miglioramento della forza muscolare e a una maggiore resistenza al danno indotto da contrazione muscolare. Questi risultati rappresentano una buona base per cominciare a passare alla fase successiva: la sperimentazione clinica. Ad ottobre 2016, la FDA (l’agenzia regolatoria dei farmaci statunitense) e la Commissione Europea hanno concesso la designazione di farmaco orfano a SGT-001, adesso Solid Bioscience sta concentrando gli sforzi sulla messa a punto e l’ottimizzazione del processo di produzione di SGT-

001 per poter fare il “salto” nell’uomo. La speranza è che si riesca ad avviare uno studio clinico di fase 1, per valutare la sicurezza della terapia, entro il prossimo anno.

Dalle strategie focalizzate al ripristino della distrofina si è passati poi all’illustrazione di nuove strategie che puntano a combattere il processo infiammatorio e degenerativo del tessuto muscolare. Sono stati presentati due progetti “made in Italy”, entrambi molto innovativi nel panorama internazionale attuale sulla Duchenne. Il primo studio è stato illustrato da **Guglielmo Sorci, dell’Università di Perugia**, ed è basato sull’utilizzo delle **cellule di Sertoli**: cellule presenti nei tubuli seminiferi del testicolo che hanno, notoriamente, proprietà anti-infiammatorie e immunomodulatoria. L’idea è di sfruttare le proprietà delle cellule di Sertoli per combattere il processo infiammatorio tipico della Duchenne. Gli studi eseguiti finora dal team italiano si basano su di un complesso protocollo: le cellule di Sertoli vengono isolate dai testicoli di maialini, allevati in condizioni particolari per non presentare fattori patogeni pericolosi per l’uomo, purificate e successivamente inglobate in microcapsule di alginato per uso clinico. Le microcapsule vengono quindi inoculate a livello addominale (nella cavità peritoneale) di topi modello per la distrofia muscolare (mdx). Le analisi effettuate dopo tre settimane hanno mostrato che una singola inoculazione di cellule di Sertoli è in grado di indurre una forte riduzione della componente infiammatoria dei muscoli con una evidente diminuzione dell’area fibrotica e necrotica del tessuto. È stata inoltre osservata anche l’induzione di utrofina - una proteina simile alla distrofina, normalmente prodotta solo durante lo sviluppo fetale, la cui produzione viene attualmente utilizzata come strategia sperimentale per la Duchenne - nelle fibre muscolari, un risultato inatteso e sorprendente. Dal punto di vista funzionale è stato osservato che i topi inoculati hanno un importante recupero della performance muscolare, paragonabile a quella dei topi sani. Gli effetti benefici di una singola inoculazione di cellule di Sertoli sono evidenti anche a lungo termine, dopo cinque mesi dall’inoculazione, e si riscontrano anche a livello del diaframma. Le microcapsule rimangono fluttuanti nella cavità peritoneale e si comportano come una “micro-bioindustria”: liberano importanti fattori, tra cui quelli anti-infiammatori, che dalla cavità peritoneale passano nel il circolo sanguigno e raggiungono ogni singolo muscolo. Si tratta quindi di un modello che potrebbe rappresentare un’innovativa strategia per combattere il processo infiammatorio muscolare tipico della Duchenne. Il trattamento non richiede alcuna immunosoppressione farmacologica ed è indipendente dal tipo di mutazione alla base della patologia. Adesso, il passo successivo è l’avvio di un progetto che ha come obiettivo l’analisi di tutta una serie di parametri chiave per poter valutare e progettare il passaggio dagli studi preclinici alla sperimentazione clinica. Questo progetto è stato appena avviato (il 1° marzo 2017), avrà una durata di 2 anni e sarà finanziato da Parent Project onlus.

Il secondo progetto “made in Italy” è stato presentato da **Graziella Messina, dell’Università di Milano**, ed è focalizzato sulla proteina **Nfix** che ha un ruolo nello sviluppo del muscolo scheletrico. In particolare, Nfix agisce sulla regolazione della rigenerazione muscolare e sulla tipologia di contrazione muscolare, l’assenza di questa proteina determina una contrazione più lenta del muscolo ma anche una rigenerazione più lenta. Partendo da questi dati, e da vecchi lavori in cui è stato dimostrato che i muscoli a contrazione lenta sono quelli che vengono preservati di più nei pazienti con distrofia muscolare, Messina ha voluto studiare un approccio del tutto alternativo rispetto a ciò che è stato fatto finora nel campo della Duchenne: depotenziare il muscolo distrofico. Gli esperimenti sono stati condotti incrociando dei topi modello per la distrofia muscolare con topi che mancano della proteina Nfix e che mostrano una contrazione lenta e una rigenerazione rallentata del muscolo. La progenie di questi topi è di tipo distrofico e senza Nfix. L’idea è quindi di rallentare la rigenerazione muscolare in topi che mostrano una distrofia muscolare. I risultati mostrati sono sorprendenti: si ha un netto miglioramento della morfologia di tutti i muscoli osservati, compreso il diaframma, con una riduzione dell’infiammazione e della fibrosi. L’effetto persiste nel tempo, fino a 12 settimane, e questo miglioramento morfologico è associato ad un

miglioramento funzionale. Il topo distrofico a contrazione lenta ha infatti una resistenza alla fatica, misurata mediante la corsa, nettamente superiore al topo distrofico e addirittura anche ad un topo sano. Ulteriori esperimenti hanno successivamente dimostrato che questi effetti si possono ottenere anche in topi in cui i segni della patologia sono in fase più avanzata, ovvero inibendo Nfix dopo 5 settimane dalla nascita. Ancora una volta i dati mostrano un netto miglioramento della componente infiammatoria e fibrotica del muscolo. Questi risultati aprono quindi la strada ad una nuova teoria per la quale rallentare la contrazione e il processo rigenerativo delle fibre muscolari potrebbe rallentare anche il processo degenerativo e preservare meglio i muscoli distrofici. Un filone di ricerca controcorrente che mette in discussione il dogma sostenuto finora da diversi studi, tra i quali i trial clinici basati sull'inibizione della miostatina, per cui un muscolo potenziato, ovvero più grosso e più rigenerante, possa affrontare meglio i danni dovuti alla Duchenne. I prossimi obiettivi del team italiano sono di trovare molecole che possano inibire selettivamente Nfix per studiare più nel dettaglio l'azione della proteina e testare l'applicabilità di questa nuova strategia nell'ambito della Duchenne.