

SESSIONE 3 – IL RIPRISTINO DELLA PRODUZIONE DI DISTROFIA, PARTE I: LA TERAPIA GENICA

Sabato 19 febbraio h14:00

Link alla registrazione: https://www.youtube.com/watch?v=yAgfuB_nst0

Il pomeriggio della terza giornata della XIX Conferenza Internazionale di Parent Project è iniziato con la sessione dedicata agli studi di terapia genica, una strategia che mira a ripristinare la produzione di una forma più piccola ma funzionale della distrofina nei muscoli dei pazienti attraverso l'impiego di virus modificati, di tipo adeno associati (AAV), che agiscono da veicoli trasferendo una versione ridotta del gene della distrofina nelle cellule del tessuto muscolare dei pazienti. La terapia genica è una strategia definita "one shot" perché basata su una singola somministrazione ed è anche un approccio per il quale ci sono ancora molte domande a cui dare una risposta, ed è proprio su questi aspetti, ma anche sui risultati clinici provenienti dagli studi in corso e fino ad ora disponibili, che si è focalizzato il Prof. Mercuri nel primo intervento della sessione. Mercuri ha illustrato i risultati incoraggianti per le terapie geniche sviluppate da Pfizer, Sarepta e Solid sottolineando però che si tratta di dati che arrivano da un numero molto limitato di pazienti e che evidenziano inoltre un'ampia variabilità nella risposta al trattamento, sarà quindi importante osservare i risultati che arriveranno dagli studi condotti in gruppi più ampi di pazienti e quelli inerenti gli effetti nel lungo periodo, così come capire se ci sono parametri specifici che possono influenzare la risposta al trattamento.

Il primo aggiornamento sugli studi di terapia genica in corso nei pazienti è stato presentato da Beth Belluscio di Pfizer che ha illustrato gli ultimi aggiornamenti sul loro programma di terapia genica con la minidistrofina Fordadistrogen Movaparovec per il trattamento della DMD. Questa strategia impiega un vettore adeno-associato di tipo 9 (AAV 9) per trasferire una versione più piccola del gene della distrofina, una minidistrofina, nelle cellule muscolari dei pazienti. Fordadistrogen Movaparovec è in valutazione nei pazienti nell'ambito di due studi clinici in corso, lo studio di fase 1b in pazienti tra i 4 e i 13 anni e quello di fase 3 per pazienti tra i 4 e gli 8 anni. L'Azienda sta inoltre pianificando due ulteriori trial che coinvolgeranno in un caso i pazienti più piccoli e nell'altro quelli più grandi e non deambulanti (vedi schema riassuntivo a seguire).

Studio	Status della deambulazione	età	Status
Studio di fase 1b	Deambulanti e non deambulanti	4-13	In corso
Studio di fase 3 CFFREO	Deambulanti	4-8	In corso
Studio di fase 2	debolmente sintomatici	2-4	In pianificazione
Studio di fase 3	Non deambulanti	Nessun limite di età	In pianificazione

Nello studio clinico di fase 1b sono stati trattati 19 pazienti e l'azienda presenterà a marzo i risultati raccolti dopo un anno dal trattamento. Sono dati importanti per la valutazione dell'efficacia poiché l'età media dei partecipanti allo studio al momento del trattamento coincide con una fase della patologia in cui i pazienti iniziano a mostrare un declino funzionale. Beth Belluscio si è poi soffermata sugli aspetti di sicurezza sottolineando che i dati provenienti dai due studi in corso vengono controllati frequentemente da un comitato indipendente che ha valutato in modo adeguato il protocollo per gestire il rischio legato al trattamento. La Belluscio si è soffermata anche sul decesso del paziente non deambulante che partecipava allo studio di fase 1b nel gruppo dei non deambolanti avvenuto a dicembre dello scorso anno negli Stati Uniti. L'azienda ritiene che si tratti di un evento altamente improbabile per il quale è stata fatta una valutazione di tutte le informazioni raccolte che sono state condivise anche con le aziende impegnate nello sviluppo di terapie geniche diverse. Si è visto che si è trattato di un evento diverso da quelli avvenuti nella piccola percentuale di pazienti in cui sono stati segnalati eventi avversi gravi. In questi pazienti infatti è stata osservata una reazione immunitaria nei confronti della proteina minidistrofina prodotta in seguito al trattamento che non è stata riscontrata nel paziente deceduto. In seguito a questo evento tutti gli studi in corso sono stati temporaneamente sospesi per consentire una valutazione appropriata del caso e ad oggi lo studio di fase 1b è ancora sospeso.

Lo studio di fase 3 nei pazienti deambolanti è invece in fase di ripresa, il trial prevede un trattamento farmacologico prima della terapia genica diverso da quello adottato nello studio di fase 1b e, per proteggere i pazienti da eventuali rischi, in questo momento l'azienda ha adottato un approccio molto conservativo. L'apertura dello studio è prevista in 30 centri in 11 Paesi diversi tra i quali l'Italia dove il trial è già in corso.

L'intervento successivo è stato quello di Valeria Lovato di Roche che ha presentato un aggiornamento per la terapia genica con la microdistrofina Delandistrogene moxeparvovec (SRP-9001) di Sarepta, sviluppata in Europa in collaborazione con Roche. In questo caso la strategia si avvale di un vettore virale derivato da virus adeno associato diverso dal precedente ed è diversa anche la versione del gene della distrofina trasferita. La sicurezza e l'efficacia di delandistrogene moxeparvovec come trattamento per la DMD è attualmente in valutazione negli studi clinici indicati nella tabella a seguire. La Lovato si è soffermata sul criterio d'inclusione inerente la mutazione adottato nei diversi studi, precisando che è un criterio che sta subendo delle modifiche dipendentemente dalle evidenze riportate nei diversi trial e che ha l'obiettivo di tutelare la sicurezza dei partecipanti. Ad oggi sono stati trattati con delandistrogen moxaparvovec oltre 80 pazienti.

Studio	età	Status della deambulazione	Status
Studio 101 di fase 1/2	4-7	deambolanti	In corso
Studio 102 di fase 2	4-7	deambolanti	In corso
Controllato con placebo			

Studio 103 di fase 1 ENDEAVOR Con materiale commerciale	>3	deambulanti e non deambulanti	C* 1-3: in corso C* 4: in reclutamento
Studio 301 EMBARK di fase 3 Controllato con placebo Con materiale commerciale	4-7	deambulanti	In reclutamento

*C= coorte

Nella seconda parte dell'intervento è stato presentato lo studio di fase 3, 301 EMBARK. Si tratta di un trial randomizzato controllato con il placebo che ha l'obiettivo di valutare la sicurezza e l'efficacia di delandistrogen moxeparavec in pazienti deambulanti tra i 4 e i 7 anni. Il trial, già in corso negli USA ma che prevede l'apertura di centri anche in Europa e in Asia, prevede due gruppi di trattamento: i pazienti di un gruppo riceveranno subito la terapia genica in studio mentre quelli del secondo gruppo saranno trattati con il placebo. Dopo 52 settimane dalla somministrazione ci sarà uno scambio tra i gruppi dove i partecipanti inizialmente trattati con il placebo riceveranno la terapia genica e viceversa. Non potranno partecipare allo studio i pazienti con mutazioni nella regione tra gli esoni 1-17 per aspetti di sicurezza emersi nei trial precedenti e quelli con mutazioni a carico dell'esone 45, le cui caratteristiche di progressione un po' più moderata della patologia renderebbero più complessa la valutazione dell'efficacia. L'obiettivo principale dello studio è dimostrare un cambiamento dopo 52 settimane dalla somministrazione attraverso la scala North Star (NSAA), mentre l'espressione della distrofina valutata nelle biopsie muscolari eseguite 12 settimane dopo la somministrazione è tra gli obiettivi secondari.

A proseguire il gruppo degli interventi dedicati agli studi di terapia genica in corso, Roxana Dreghici di Solid Biosciences ha illustrato gli ultimi aggiornamenti per la terapia genica con la microdistrofina SGT-001 valutata nello studio clinico IGNITE DMD in corso. La versione del gene della microdistrofina impiegata da Solid contiene un elemento per l'interazione con altre proteine presente nel gene originale che potrebbe avere un ruolo importante nel prevenire il danno muscolare. Lo studio IGNITE DMD è un trial di fase 1/2 iniziato nel 2018 che ha l'obiettivo di valutare la sicurezza e il cambiamento nell'espressione della microdistrofina valutata nelle biopsie muscolari dei partecipanti. Ad oggi sono stati trattati 9 pazienti con SGT-001, 3 con un dosaggio minore e 6 con un dosaggio maggiore pari a 2E14vg/kg. L'azienda prevede di trattare altri pazienti con quest'ultimo dosaggio. Per quanto riguarda la sicurezza, le reazioni avverse più comuni dopo il trattamento sono state la nausea, il vomito e la febbre nei giorni immediatamente successivi alla somministrazione. Tutti i partecipanti allo studio hanno inoltre mostrato un'attivazione del complemento (una risposta immunitaria) che in tre pazienti ha causato reazioni avverse gravi fortunatamente pienamente risolte. A distanza di 3.5 anni dalla somministrazione, tutti i pazienti trattati stanno bene e continuano ad eseguire i controlli a lungo termine. L'azienda continua a migliorare tutti gli aspetti di sicurezza relativi al trattamento ottimizzando sia il protocollo di mitigazione del rischio applicato nei partecipanti prima e dopo la somministrazione di SGT-001 che il processo di produzione del prodotto di terapia genica. Rispetto ai risultati clinici fino ad ora disponibili, la Dreghici ha mostrato i dati incoraggianti relativi alle valutazioni della funzionalità motoria e polmonare fino a 18 mesi dopo la somministrazione nei primi 3 pazienti trattati con il dosaggio maggiore di SGT-001. Oltre alla prosecuzione dello studio IGNITE DMD in corso nella

popolazione di pazienti deambulanti tra i 4 e gli 11 anni, Solid sta anche pianificando uno studio per pazienti più grandi, deambulanti e non deambulanti, uno per la registrazione e uno studio di storia naturale per migliorare la comprensione della patologia. L'azienda sta inoltre valutando potenziali strategie immunosoppressive alternative da adottare nei prossimi studi. Nell'ultima parte della sua presentazione la Dreghici si è soffermata su SGT-003, una nuova terapia genica che sta sviluppando l'Azienda e che impiega la stessa versione della microdistrofina di SGT-001 ma un vettore virale diverso, che permette una maggiore distribuzione nei muscoli e un'espressione minore nel fegato. I topi trattati con questa nuova versione della terapia genica mostrano una stabilità muscolare migliore.

L'intervento successivo è stato quello di Oliver Danos di RegenXbio che ha presentato gli ultimi aggiornamenti per la loro terapia genica con la microdistrofina denominata RGX-202. La strategia impiega una nuova microdistrofina avanzata e ottimizzata che include elementi chiave presenti nel gene originale della distrofina e un vettore virale adeno associato AAV8. I risultati ottenuti nei topi mdx trattati con RGX-202 sono stati incoraggianti, è stata infatti rilevata una robusta espressione della microdistrofina nel muscolo scheletrico e cardiaco e un miglioramento del profilo patologico del muscolo (infiammazione, degenerazione, fibrosi) con un aumento significativo della funzionalità muscolare.

A dicembre 2021 l'azienda ha completato la richiesta alla FDA per un nuovo farmaco sperimentale (IND) per RGX-202 ed è ora possibile avviare uno studio clinico di fase 1/2. Il trial sarà uno studio multicentrico, in aperto, per valutare la sicurezza, la tollerabilità e l'efficacia clinica di una singola somministrazione intravena di RGX-202 nei pazienti Duchenne. Lo studio partirà negli Stati Uniti nella prima metà del 2022 e coinvolgerà pazienti tra i 4 e gli 11 anni, deambulanti, con una mutazione nel gene per la distrofina tra gli esoni 18 e 58 che non abbiano anticorpi pre-esistenti per l'AAV8. La valutazione dell'efficacia includerà la determinazione dei livelli di produzione della microdistrofina nel muscolo 3 mesi dopo il trattamento, la valutazione della forza e funzionalità muscolare e la risonanza magnetica. Il disegno sperimentale dello studio prevede un aumento graduale del dosaggio con ampliamento della popolazione coinvolta fino a 18 partecipanti. In base a questo schema i primi 3 partecipanti allo studio riceveranno RGX-202 al dosaggio di $1E14$ vg/kg e dopo una valutazione dei dati di sicurezza, si passerà al trattamento di altri 3 pazienti con il dosaggio maggiore. Fermo restando una valutazione positiva della sicurezza, ogni gruppo di dosaggio sarà inoltre ampliato aggiungendo 6 partecipanti ciascuno.

Lo studio clinico di terapia genica con la microdistrofina GNT0004 di Genethon, è stato presentato da Francesco Muntoni del Dubowitz Neuromuscular Centre di Londra, uno dei principali sperimentatori dello studio. Si tratta di una strategia che impiega un vettore virale di tipo AAV8 che ha iniziato la fase di valutazione nei pazienti DMD. Nella prima parte della presentazione Muntoni ha illustrato lo studio di storia naturale in corso, che precede il trial di terapia genica vero e proprio, che sta reclutando 100 pazienti DMD deambulanti in quattro Paesi: Regno Unito, Francia, Stati Uniti e Israele. L'obiettivo di questo studio è stabilire quale sia il momento migliore per somministrare la terapia genica con la microdistrofina. È stato infatti stabilito che per capire al meglio il possibile effetto del trattamento con GNT0004, saranno coinvolti nel trial pazienti che hanno superato il periodo in cui si osserva un miglioramento della funzionalità muscolare e che sono invece in una fase di plateau stabile o nella parte iniziale di perdita della funzionalità. Muntoni ha poi illustrato il disegno del trial con GNT0004 che sarà uno studio di fase 1/2/3 che

coinvolgerà pazienti DMD deambulanti tra i 6 e i 10 anni e con punteggio alla NSAA stabile o in declino, superiore a 18. Lo studio è diviso in tre parti, la prima ha l'obiettivo di determinare il dosaggio della terapia genica che sarà impiegato nella seconda parte del trial e valuterà due dosaggi di GNT0004 in 6 pazienti (3 pazienti per ogni dosaggio valutato). La seconda parte dello studio valuterà la sicurezza e l'efficacia di GNT0004 al dosaggio identificato in precedenza e vedrà la partecipazione di 42 pazienti, 21 dei quali riceveranno la terapia genica e 21 il placebo. Dopo un anno dalla somministrazione anche i pazienti che hanno ricevuto il placebo saranno trattati con GNT0004 e tutti i pazienti saranno seguiti per 4 anni. La terza parte dello studio avrà infine l'obiettivo di valutare la sicurezza, tollerabilità ed efficacia a lungo termine.

Il trial è partito e il primo paziente trattato ha manifestato una sospetta reazione avversa grave inattesa (Suspected Unexpected Serious Adverse Reaction - SUSAR) 42 giorni dopo l'infusione. Il paziente si è poi ripreso ma nell'attesa di comprendere meglio i motivi alla base di questo evento lo studio è stato temporaneamente sospeso.

Gli ultimi due interventi della sessione hanno infine illustrato strategie di terapia genica che diversamente dalle precedenti puntano a trasferire nelle cellule muscolari dei pazienti geni che consentono una produzione continua di molecole antisense progettate per ottenere uno skipping duraturo di specifici esoni.

Nel caso della strategia di terapia genica per la duplicazione dell'esone 2 sviluppata da Kevin Flanigan del Nationwide Children's Hospital negli Stati Uniti, è stata progettata una molecola antisense specifica per lo skipping dell'esone 2, costruita inserendo sequenze antisense specifiche per questo esone all'interno di una sequenza di RNA denominata piccolo RNA nucleare U7 (U7snRNA). Nel suo intervento Flanigan ha spiegato innanzitutto da dove è nata la strategia. Studi condotti in precedenza in pazienti con mutazioni nell'esone 1 del gene della distrofina avevano identificato un elemento presente nell'esone 5 capace di guidare la produzione di una versione poco più piccola della proteina normale, proprio perché prodotta a partire da questo sito alternativo. Questo elemento chiamato tecnicamente IRES (Internal ribosomal entry site) è attivo e guida la produzione della stessa variante più breve della proteina distrofina anche nei rarissimi pazienti con una delezione dell'esone 2 che, in virtù dell'assenza di sintomi, non vengono quasi mai diagnosticati, ma non viene invece usato nei pazienti con duplicazioni dello stesso esone. A partire da questa osservazione è stata quindi sviluppata una strategia di terapia genica che ha puntato a ripristinare la capacità di produrre la distrofina inducendo lo skipping dell'esone 2. Attraverso lo skipping di questo esone, infatti, se una sola copia dell'esone duplicato viene rimossa si crea una situazione identica alla distrofina normale con la produzione della proteina completa, se invece vengono rimosse entrambe le copie dell'esone duplicato si crea una situazione analoga a quella dei pazienti con delezione dell'esone 2 con l'attivazione dell'IRES e la produzione della versione più breve della distrofina. La strategia valutata da Flanigan impiega una molecola denominata AAV9.U7-ACCA, in cui 4 copie di U7snRNA contenenti l'oligonucleotide antisense specifico per l'esone 2 sono state inserite in un vettore virale di tipo AAV9. La molecola è stata valutata in uno studio di fase 1/2 in 2 pazienti DMD con duplicazione dell'esone 2, di 8 e 13 anni. I risultati raccolti dallo studio hanno evidenziato una bassa tossicità, una certa percentuale di produzione di distrofina, sia pur bassa, a distanza di 3 e 6 mesi dal trattamento e una stabilità nella funzionalità muscolare e cardiaca 12 mesi dopo il trattamento. È stato inoltre trattato un terzo paziente di soli 7 mesi in cui è stato evidenziato un calo importante nella creatina chinasi sierica e

che sarà importante seguire nel tempo per capire il potenziale della strategia nel contesto di un muscolo che non ha ancora subito le conseguenze della DMD.

Nell'ultimo intervento della sessione sono stati presentati gli aggiornamenti per la terapia genica *ex vivo* per la DMD sviluppata da Giulio Cossu dell'Università di Manchester. La strategia è il risultato di un processo di ottimizzazione dell'approccio originale sviluppato dallo stesso gruppo, valutato diversi anni fa in uno studio clinico in 5 pazienti DMD, che si basa sul trapianto di cellule capaci di differenziare in cellule muscolari, chiamate mesangioblasti, prelevate da un donatore immuno compatibile. I risultati di questo studio indicarono un'efficacia estremamente bassa della strategia e il gruppo di ricerca di Cossu ha quindi iniziato a lavorare all'ottimizzazione del protocollo di trapianto e al miglioramento della capacità di queste cellule di raggiungere il muscolo dei pazienti. Attualmente la terapia in sviluppo si focalizza sull'isolamento dei mesangioblasti che vengono prelevati dai pazienti, modificati in laboratorio trasferendo al loro interno una molecola per lo skipping dell'esone 51 e poi somministrati nuovamente al paziente (terapia genica *ex vivo*). Il protocollo per lo studio clinico nei pazienti DMD è già stato approvato ed era stata avviata la preparazione dei mesangioblasti corretti isolati da un paziente, ma a causa del COVID e delle innumerevoli problematiche legate alla pandemia, non è stato possibile proseguire lo studio con la somministrazione delle cellule corrette nel paziente e sarà ora necessario ricominciare la procedura.

*A cura dell'Ufficio Scientifico di Parent Project aps e delle dottorande del progetto europeo Renoir - Filipa Timoteo Ferreira, Cristina Rodríguez Gutiérrez, Emilia Skafida e Sarah Willems
(<https://renoir-itn.eu/>)*