

## Report sessione 5 - Il Ripristino della Distrofina, parte 2: La correzione genica

Ha concluso la terza ricchissima giornata della XIX edizione della Conferenza Internazionale di Parent Project una sessione sulle **strategie di correzione genica**, nella quale abbiamo assistito a una panoramica di interventi delle diverse aziende impegnate nello sviluppo di molecole di exon skipping e un intervento conclusivo del Prof. Mercuri sulla correzione delle mutazioni nonsense. Per riguardare la sessione potete andare sul seguente [link](#), a partire dal minutaggio 3:32:20.

Il primo intervento è stato quello di Lorna Hill e Jon Tinsley di **Sarepta Therapeutics**, che hanno presentato un **aggiornamento sulle terapie che agiscono sull'RNA: PMO e PPMO**. I PMO sono molecole antisense di tipo morfolino fosforodiamidato, mentre i PPMO sono molecole analoghe ai PMO, ma cosiddette di nuova generazione, in cui l'aggiunta di un peptide ne migliora la capacità di penetrare nelle cellule bersaglio e l'efficacia di exon-skipping.

Sarepta ha al momento tre programmi clinici con i PMO che mirano allo skipping degli esoni 51, 53 e 45 che, nel loro insieme, possono coprire fino al 30% dei pazienti Duchenne. Sono tutti e tre studi disegnati per valutare la sicurezza, la tollerabilità e l'efficacia di ognuna delle 3 molecole in studio. Il primo è MIS51ON, uno studio randomizzato con alti dosaggi della molecola SRP-4051 (eteplirsen o Exondys 51) per lo skipping dell'esone 51, in confronto al dosaggio più basso di 30 mg/Kg già approvato negli Stati Uniti. Lo studio durerà 144 settimane e verranno reclutati 152 pazienti deambulanti di età compresa tra i 4 e i 13 anni in 40 siti a livello globale, inclusa l'Italia. Il secondo è lo studio skip-NMD, uno studio di fase 1/2 che ha valutato il dosaggio della molecola SRP-4053 (golodirsen o vyondys53) approvata negli Stati Uniti per lo skipping dell'esone 53. In ultimo abbiamo lo studio ESSENCE attualmente in corso e in reclutamento anche in Italia, che include le due molecole approvate negli Stati Uniti SRP-4045 (casimersen o Amondys 45,) e SRP-4053, per lo skipping rispettivamente degli esoni 45 e 53. Anche quest'ultimo è uno studio randomizzato controllato con placebo che recluterà fino a 222 pazienti deambulanti di età compresa tra i 6 e i 13 anni.

Per quanto riguarda i PPMO, l'azienda sta portando avanti negli Stati Uniti, in Canada e in Europa, lo studio clinico di fase 1 MOMENTUM, che prevede somministrazioni ogni 4 settimane della molecola SRP-5051, una versione migliorata della molecola di skipping dell'esone 51 di tipo PMO (eteplirsen). I recenti risultati della parte A dello studio con dosi multiple crescenti di farmaco su pazienti deambulanti e non, di età compresa tra i 7 e i 21 anni, hanno messo in evidenza che tutti i partecipanti in entrambi i gruppi di trattamento (20 o 30 mg/Kg) hanno mostrato livelli maggiori di exon skipping e di produzione di distrofina rispetto al trattamento con eteplirsen. Inoltre, le biopsie muscolari del gruppo di trattamento a 30mg/kg hanno mostrato una corretta localizzazione della proteina nella membrana muscolare e la maggior parte degli eventi avversi erano lievi o moderati e facilmente gestibili. Pertanto MOMENTUM è passato alla Parte B dello studio che è al momento in fase di reclutamento. Verranno inclusi sia pazienti (circa 30) provenienti dalla parte A dello studio con SRP-5051, in cui verranno valutate la sicurezza, la tollerabilità e la farmacocinetica, senza la necessità di biopsia muscolare; sia pazienti che non hanno mai assunto il farmaco prima (cosiddetti *naïve*) per i quali l'endpoint primario sarà il cambiamento dei livelli di distrofina. Questo secondo gruppo includerà circa 30 pazienti deambulanti e non, di età compresa tra i 7 e i 21 anni, con funzionalità polmonare stabile e in

trattamento stabile con corticosteroidi o che non abbiano mai assunto corticosteroidi e che si dovranno sottoporre a 2 biopsie muscolari.

Durante il secondo intervento, di **NS-Pharma**, Robert Crozier ha presentato gli **aggiornamenti su VILTEPSO (viltolarsen)**, un farmaco per lo skipping dell'esone 53 approvato negli Stati Uniti e in Giappone nel 2020, ma non ancora in Europa. Nell'ottobre 2019 è stato avviato lo studio randomizzato di fase 3 denominato Racer53, che servirà come trial confermatario per l'approvazione accelerata. Questo studio è in corso anche in Europa e nello specifico anche in Italia presso il Policlinico Agostino Gemelli di Roma. Un altro trial attualmente in corso è denominato Galactic 53, ha un sito anche a Roma e coinvolge pazienti deambulanti e non deambulanti. Per ulteriori informazioni su Racer53 e Galactic53 si può visitare il sito [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov).

I dati presentati dal Dott. Crozier sono quelli relativi allo studio clinico di fase 2, condotto in Nord America, che ha consentito di ottenere l'approvazione accelerata. Questo studio ha previsto anche un braccio a lungo termine di cui sono stati mostrati i risultati intermedi lo scorso anno nel corso di diverse conferenze. Si trattava di uno studio randomizzato, in doppio cieco e controllato con placebo, condotto con due differenti dosaggi della molecola sperimentale viltolarsen, a basso e ad alto dosaggio (40 e 80 mg/Kg rispettivamente) in pazienti di età compresa tra i 4 e i 10 anni, per 24 settimane. Al termine di questo periodo è stato possibile entrare in uno studio di estensione della durata di 192 settimane. Le valutazioni primarie includevano la sicurezza, la tollerabilità, la produzione di distrofina e la farmacocinetica. Altre valutazioni cliniche secondarie includevano test funzionali, i livelli di exon skipping, la localizzazione della proteina.

Si è visto che il trattamento con viltolarsen era in grado di indurre un incremento di espressione di distrofina in tutti gli 8 pazienti trattati, che partendo da una media dello 0.6% a inizio studio arrivava a una media di 5.9% dopo 24 settimane di trattamento con una differenza statisticamente significativa. I test di funzionalità motoria temporizzati hanno inoltre evidenziato miglioramenti rispetto a un gruppo di storia naturale, alcuni già a partire dalla tredicesima settimana dall'inizio del trattamento.

Per quanto riguarda le reazioni avverse, una certa attenzione deve essere prestata agli effetti sui reni; altri effetti collaterali potrebbero includere infezioni delle alte vie respiratorie, reazioni al sito di iniezione, tosse e febbre.

Il farmaco viene ora impiegato come farmaco approvato con una dose raccomandata di 80 mg/kg (alto dosaggio) e viene somministrato settimanalmente come infusione intravenosa.

Nel suo programma di sviluppo, l'azienda sta studiando altre molecole per lo skipping degli esoni 44, 45, 50, 51 e 55, attualmente tutti in fase preclinica a eccezione della strategia per l'esone 44, per la quale sperano di avviare un trial di fase 2 in Giappone entro l'anno.

Ash Dugar, di **Dyne Therapeutics**, ha presentato la piattaforma FORCE, sviluppata dall'azienda per combattere la Duchenne e altre patologie muscolari e ha parlato di **trasformare il modello terapeutico per la distrofia muscolare di Duchenne**. La piattaforma è stata infatti disegnata per ottimizzare l'ingresso di un oligonucleotide antisense di tipo morfolino fosforodiamidato (PMO) nelle cellule muscolari, grazie all'aggiunta di un frammento specifico per il trasferimento, denominato Fab (frammento che lega l'antigene), disegnato per legare in maniera specifica il recettore della transferrina 1 (TfR1) che si trova sulla superficie delle cellule muscolari. Il legame del

Fab con il recettore specifico permette all'oligonucleotide di essere rilasciato nelle cellule del muscolo scheletrico, cardiaco e liscio per andare ad agire sul gene della distrofina.

La piattaforma è stata testata nel topo modello mdx con mutazione nell'esone 23 per valutare il livello e la durabilità di exon skipping e la produzione di proteina nel quadricipite, nel diaframma e nel cuore. I risultati hanno mostrato una produzione di distrofina robusta e duratura in seguito a una singola somministrazione di farmaco a 10 o 30 mg/Kg. Il picco di efficacia di exon skipping viene raggiunto dopo una settimana di somministrazione, sia a livello di cuore, che di quadricipite che di diaframma, mentre il picco di produzione di distrofina viene osservato a partire dalla quarta settimana. Successivamente il candidato clinico DYNE-251, l'attuale potenziale terapia dell'azienda disegnata per promuovere lo skipping dell'esone 51, è stato valutato su modelli di primate con regimi di dosaggio multiplo e anche su questo modello si sono osservati livelli robusti di exon skipping nei quadricipiti, nel cuore e nel diaframma. DYNE-251 si è inoltre dimostrato sicuro e ben tollerato in questo modello.

L'azienda ha in programma l'avvio di un trial clinico per il quale prevedono di iniziare le prime somministrazioni entro il primo semestre di quest'anno. Sarà uno studio globale, con dosi multiple crescenti, controllato con placebo e che prevede un periodo di estensione a lungo termine. Verranno inclusi tra i 30 e i 40 pazienti DMD con mutazioni potenzialmente trattabili con lo skipping dell'esone 51, di età compresa tra i 4 e i 16 anni, deambulanti e non. Gli obiettivi principali dello studio includeranno la sicurezza e tollerabilità, la farmacocinetica e farmacodinamica, i livelli di distrofina prodotta e le misurazioni della funzionalità muscolare.

Il focus iniziale dell'azienda è la strategia per lo skipping dell'esone 51, ma l'obiettivo nel lungo periodo è quello di lavorare sullo skipping di altri esoni, arrivando potenzialmente ad avere delle terapie che possano includere l'80% dei pazienti che hanno mutazioni potenzialmente trattabili con una strategia di exon skipping.

L'intervento successivo, dal titolo **Sviluppo della piattaforma AOC di exon skipping per il trattamento della distrofia muscolare di Duchenne**, è stato a cura di Mark Stahl, di **Avidity Bioscience**, che ha introdotto la tecnologia AOC (antibody-oligonucleotide conjugate) sviluppata dall'azienda. La presenza di uno specifico anticorpo all'interno di questo sistema permette all'oligonucleotide antisense di essere trasferito direttamente nelle cellule muscolari e in quelle cardiache. L'anticorpo impiegato riconosce nello specifico una proteina trasportatrice chiamata recettore per la transferrina 1, che si trova sulla superficie delle cellule muscolari e cardiache e permette di rilasciare al loro interno l'oligonucleotide terapeutico. La presenza dell'anticorpo permette di aumentare la quantità di oligonucleotide in grado di entrare nelle cellule bersaglio, con la conseguenza di avere somministrazioni potenzialmente più efficaci e meno frequenti.

L'azienda sta al momento lavorando allo sviluppo di diversi farmaci di exon skipping per pazienti Duchenne con mutazioni potenzialmente trattabili con lo skipping degli esoni 44, 45 e 51.

Il loro primo programma impiega una molecola denominata AOC 1044 in grado di indurre lo skipping dell'esone 44. Studi preclinici condotti su cellule di pazienti in vitro trattate con questa molecola hanno mostrato un livello di exon skipping fino al 60%. Studi sul modello di topo con la stessa molecola hanno inoltre mostrato una elevata specificità per l'esone 44. Inoltre, si è visto che AOC 1044 è in grado di rimanere in circolo per lunghi periodi, consentendo la possibilità di fare somministrazioni una volta al mese. Dai risultati degli studi preclinici con questa prima molecola l'azienda spera di acquisire conoscenze in più per portare avanti gli altri due programmi in sviluppo

per lo skipping degli esoni 45 e 51, per poter potenzialmente trattare fino al 30% dei pazienti Duchenne.

L'azienda ha in programma di partire con il suo primo studio clinico sui pazienti con mutazioni trattabili con lo skipping dell'esone 44 entro la fine del 2022.

Con una presentazione dal titolo **sfruttare il potenziale delle terapie a base di oligonucleotidi**, James McArthur, di **PepGen**, ha introdotto la tecnologia EDO (Enhanced Delivery Oligos) sviluppata dall'azienda per il trattamento della Duchenne. L'approccio combina dei peptidi di trasferimento di nuova generazione – ingegnerizzati per fornire aumentate tollerabilità e attività – con degli oligonucleotidi di tipo morfolino fosforodiamidato (PMO) che sono ben caratterizzati e clinicamente validati, per favorire un assorbimento cellulare molto più efficiente. L'obiettivo è di avere un trasferimento migliore a livello di muscolo scheletrico, cardiaco e diaframmatico, ma anche a livello di sistema nervoso centrale, ottenendo un livello di exon skipping estremamente efficiente, a dosi di farmaco tollerate, con maggiore produzione di distrofina e impatto evidente sulla patologia.

Il loro primo prodotto candidato è PGN-EDO51, che agisce promuovendo lo skipping dell'esone 51. Sono stati raccolti moltissimi dati da studi preclinici, che hanno dimostrato un ripristino robusto di distrofina anche a bassi dosaggi e dopo una singola somministrazione in diversi modelli animali. Studi condotti su modelli di primate hanno dimostrato che la piattaforma EDO è in grado di ottenere alti livelli di exon skipping nel tessuto muscolare scheletrico e cardiaco a un dosaggio di 20 mg/Kg, raggiungendo quasi il 60% di exon skipping dell'esone 51 nel muscolo scheletrico, più del 60% nel diaframma e il 20% nel cuore. Aumentando la dose a 30 mg/Kg l'efficienza di exon skipping aumenta di conseguenza. Ulteriori studi in questo senso hanno dimostrato che PGN-EDO51 mostra una potenza di exon skipping maggiore rispetto a qualsiasi altro farmaco di exon skipping del 51 approvato o candidato. Questi studi hanno anche dimostrato che a dosaggi clinicamente rilevanti EDO51 ha buoni livelli di sicurezza e tollerabilità sia nei modelli di topo che di primate, con l'ipomagnesemia (bassi livelli di magnesio nel sangue) come unico effetto collaterale, considerato comunque gestibile a livello clinico. Dopo aver terminato lo studio sui primati è stata sottomessa alle autorità regolatorie la richiesta per trial clinico, che è lo step preliminare per poter passare agli studi sull'uomo. L'azienda prevede quindi di riuscire a partire con le prime somministrazioni su volontari sani nei prossimi mesi e di riuscire a reclutare il primo paziente Duchenne all'inizio del 2023.

Il programma di sviluppo prevede inoltre la molecola PGN-EDO53, per lo skipping dell'esone 53, attualmente in valutazione con studi preclinici su modelli di primate, e lo sviluppo di altre due molecole per lo skipping degli esoni 45 e 44.

Ha concluso questa interessante sessione il **Prof. Eugenio Mercuri**, del Policlinico Gemelli, che ci ha parlato di **mutazioni nonsense** e della terapia con Translarna per correggere questo tipo di mutazioni. Una mutazione nonsense consiste in una sostituzione di una singola lettera nella sequenza del DNA che introduce un segnale di stop in una zona interna del gene. Questa mutazione causa l'interruzione anticipata della lettura del gene e, quindi, la produzione di una forma più corta della distrofina che viene degradata. Translarna consente di bypassare questo codone di stop generato dalla mutazione nonsense e di produrre una proteina a lunghezza intera e

funzionale. Il farmaco è ben conosciuto e approvato a un dosaggio di 40mg/Kg giornalieri in pazienti deambulanti a partire dai 2 anni di età in Europa, Islanda, Liechtenstein, Norvegia, Gran Bretagna, Irlanda del Nord, Kazakistan, Israele e Repubblica di Corea. È inoltre indicato in pazienti sopra ai 5 anni in Cile, Brasile e Ucraina.

Numerosi studi di fase 2b e 3 hanno portato all'approvazione del farmaco diversi anni fa. Tuttavia quest'anno è stato fatto uno studio di meta-analisi, ossia uno studio che raccoglie i dati provenienti da studi precedenti. L'analisi ha mostrato che ogni volta che lo studio includeva un gruppo placebo, i risultati erano sempre a favore di Translarna rispetto al placebo, ossia i bambini che assumevano il farmaco avevano sempre un andamento migliore, quindi una progressione più lenta, della patologia. Per valutare cosa sarebbe accaduto una volta ottenuta l'approvazione e quindi dal momento in cui una popolazione più ampia, senza criteri di inclusione specifici tipici di un trial, avevano accesso al farmaco, è stato avviato uno studio di monitoraggio a lungo termine in cui i dati sono raccolti in un registro denominato registro STRIDE (Strategic Targeting of Registries and International Database of Excellence), con l'obiettivo di raccogliere i risultati cosiddetti di real world, ossia cosa succede nella vita reale quando il farmaco diventa disponibile.

Si tratta di uno studio internazionale osservazionale, attualmente in corso, per valutare la sicurezza e l'efficacia di Translarna per un periodo di 5 anni in pazienti con mutazioni nonsense. Nel gennaio 2021, un numero totale di 288 pazienti erano stati inclusi nel registro in 64 centri clinici in 13 paesi, e sono ancora monitorati. La popolazione inizialmente inclusa nel registro includeva 269 pazienti con un'età media di diagnosi di 4,9 anni e un'età media di inizio assunzione di Translarna di 9,2 anni. Il periodo medio di assunzione del farmaco per i pazienti è stato di 1352 giorni, un periodo sicuramente più lungo di quello visto con i trial clinici. Le valutazioni sulla sicurezza si sono mostrate coerenti con il profilo di sicurezza già dimostrato per Translarna. La maggior parte degli eventi avversi dovuti al trattamento evidenziati erano lievi o moderati.

Per valutare l'andamento di questi pazienti è stata selezionata una popolazione di controllo comprendente una parte della popolazione di pazienti Duchenne inclusi nello Studio di Storia Naturale (DNHS) del Gruppo Cooperativo Internazionale di Ricerca Neuromuscolare (CINGR). I pazienti dallo studio STRIDE sono stati accoppiati a specifici pazienti provenienti dal gruppo DNHS con caratteristiche simili (età di perdita di deambulazione, età di inizio e durata di assunzione steroidi), creando un gruppo di controllo molto simile a quello trattato. Si è visto che i pazienti in STRIDE che hanno ricevuto Translarna hanno perso la deambulazione 5,4 anni più tardi rispetto ai corrispettivi pazienti nello studio di storia naturale. La capacità vitale forzata (FVC) confrontata in entrambi i gruppi ha inoltre mostrato un ritardo nel declino della funzionalità polmonare per i pazienti in STRIDE rispetto alla popolazione di controllo.

Il trattamento con Translarna a lungo termine nei pazienti Duchenne con mutazioni nonsense si è dunque dimostrato efficace nel ritardare la perdita di deambulazione e il declino della funzionalità polmonare, al tempo stesso mostrando una buona tollerabilità e un profilo di sicurezza paragonabile a quello già visto negli studi clinici precedenti.

*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/>)*