

## Conferenza Annuale PPMD 2017 sulla distrofia muscolare di Duchenne e Becker

### Aggiornamenti sui trial clinici in corso e in avvio Parte 1

*Quest'anno la Conferenza Internazionale PPMD, il Parent Project statunitense, si è svolta dal 29 giugno al 2 luglio a Chicago. Per quattro intense giornate si sono riunite famiglie, rappresentanti di associazioni di pazienti, clinici, ricercatori e aziende farmaceutiche per parlare di gestione clinica, ricerca e, soprattutto, di studi clinici. Come da tradizione, Parent Project Onlus ha partecipato a questo importante evento, come prezioso momento di confronto con la comunità scientifica internazionale e con le comunità di pazienti provenienti dai diversi Paesi nel mondo. È stata inoltre una preziosa occasione per fare il punto della situazione sui trial clinici e poter riportare alle famiglie italiane gli ultimissimi aggiornamenti su questo fronte.*

*In questo primo report sono illustrati gli aggiornamenti degli studi clinici nell'ambito della terapia genica, dell'editing genomico, dell'exon skipping e della modulazione dell'utrofina.*

di Francesca Ceradini

#### **Terapia genica ed editing genomico**

Un'importante novità della conferenza è stata la sessione dedicata alla terapia genica, un approccio ambizioso studiato da oltre 15 anni nel campo della Duchenne ma che per la sua complessità non ha ancora dato i risultati sperati. L'idea di base è di riuscire a compensare la mancanza di distrofina, che è alla base della distrofia muscolare di Duchenne, veicolando all'interno del tessuto muscolare il gene sano della distrofina mediante un vettore virale. Purtroppo le grandi dimensioni del gene, e le limitate dimensioni dei vettori generalmente utilizzati per la terapia genica, rendono l'impresa impossibile. I ricercatori non si sono però arresi e, grazie ad una serie di progressi scientifici e tecnologici acquisiti in questi ultimi anni, diversi gruppi di ricerca hanno messo a punto una strategia di terapia genica basata sull'utilizzo di una forma di dimensioni ridotte, ma funzionale, del gene della distrofina – la cosiddetta **microdistrofina** – che può essere veicolata mediante i vettori virali utilizzati per la terapia genica.

Gli aggiornamenti su questo fronte sono stati illustrati da **Louise Rodino-Kaplan**, un'esperta nel campo della terapia genica che lavora con il **gruppo di ricerca di Jerry Mendell del Nationwide Children's Hospital's Research Institute in Ohio**, dall'azienda farmaceutica **Pfizer** e dalla biotech **Solid Bioscience**. In tutti e tre i casi si è in fase di conclusione degli studi preclinici e nella fase di programmazione dell'avvio di trial clinici entro un anno.

**Louise Rodino-Kaplan** ha annunciato che il Nationwide Children's Hospital sta completando l'iter burocratico per l'avvio di un trial di fase 1/2 su pazienti Duchenne entro il prossimo autunno. Si tratta di uno studio per valutare la sicurezza della somministrazione per via sistemica (nella circolazione sanguigna) di microdistrofina veicolata in un vettore adenovirus-associato ideato per avere come bersaglio il tessuto muscolare (AAV-6). I pazienti saranno trattati con una terapia

immunosoppressiva prima della somministrazione del trattamento - questo viene effettuato per evitare che si scateni una risposta immunitaria contro la microdistrofina che può essere riconosciuta come “estranea” dall’organismo - e saranno monitorati per la durata di 2 anni. I dettagli dello studio clinico e i criteri di reclutamento non sono stati resi noti.

**Katherine Beaverson** ha illustrato gli sviluppi di **Pfizer**, che è entrata nel campo della terapia genica per la Duchenne ad agosto 2016 con l’acquisizione di Bamboo Therapeutics, una biotech focalizzata sullo sviluppo di terapie geniche per il trattamento di alcune malattie rare nell’ambito delle patologie neuromuscolari e del sistema nervoso. Gli studi preclinici basati sulla somministrazione per via sistemica di microdistrofina con vettori adenovirus-associato ricombinanti (rAAV) in modelli animali (topi e cani) hanno dato buoni risultati. Nei cani modello per la distrofia muscolare è stato osservato un’espressione a lungo termine (fino a 8 anni) della microdistrofina e un miglioramento della funzionalità muscolare. Questo approccio terapeutico ha ricevuto la designazione di farmaco orfano negli Stati Uniti e in Europa. Beaverson ha annunciato che Pfizer prevede di avviare entro un anno un trial di fase 1/2 per valutare la sicurezza e dati preliminari sull’efficacia. I dettagli dello studio clinico non sono ancora noti.

**Carl Morris** ha infine illustrato gli aggiornamenti su **SGT-001**, l’approccio di terapia genica ideato da **Solid Bioscience**, una biotech fondata da genitori di bambini e ragazzi DMD focalizzata esclusivamente nell’identificare terapie per la distrofia muscolare di Duchenne. Anche in questo caso la strategia si basa sul binomio microdistrofina-AAV. Gli studi preclinici, effettuati su cani modello per la distrofia muscolare, hanno mostrato che una singola somministrazione di SGT-001 per via sistemica determina un’espressione duratura (fino a 24 mesi) e significativa di microdistrofina non solo nei muscoli, ma anche nel diaframma e nel cuore. La produzione di microdistrofina è inoltre associata a un miglioramento della funzionalità muscolare e non ha dato alcuna risposta immunitaria. Ad ottobre 2016 SGT-001 ha ottenuto la designazione di farmaco orfano negli Stati Uniti e in Europa, e adesso Solid Bioscience sta pianificando l’avvio di un trial clinico, entro la fine del 2017, per valutare la sicurezza e l’efficacia del trattamento nei pazienti Duchenne.

Durante la sessione di terapia genica si è parlato anche di **editing genomico**, l’innovativa e dibattuta tecnica di ingegneria genetica che permette di effettuare un “taglia e cuci” del DNA in maniera estremamente precisa, versatile e rapida. Le potenzialità di questa nuovissima strategia per la distrofia muscolare di Duchenne sono state illustrate da **Eric Olson**, del **Southern Medical Center dell’Università del Texas**. Olson è uno tra i massimi esperti di malattie muscolari e, in questi ultimi anni, il suo laboratorio ha portato avanti una serie di studi preclinici per testare il sistema di editing genomico denominato Crispr su topi modello per la distrofia muscolare e su cellule prelevate da pazienti DMD. Il meccanismo di azione di Crispr è molto semplice e si basa su due elementi: 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. 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 che viene utilizzato per la terapia genica. I diversi studi preclinici 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. La differenza sostanziale tra l’editing genomico e altri approcci quali la terapia genica, o l’exon skipping, è che Crispr interviene sul DNA, ovvero correggendo direttamente e in maniera definitiva il codice genetico stesso del paziente. I risultati ottenuti finora hanno dimostrato un’elevatissima efficienza con una produzione di distrofina fino al 80%, sia nelle cellule muscolari umane coltivate in laboratorio sia nel tessuto

muscolare dei topi, associata ad una diminuzione dell'infiammazione e degenerazione del tessuto muscolare e un significativo incremento della forza muscolare nei topi. La tecnologia Cripsr assicura un alto grado di precisione e la possibilità di andare ad operare “chirurgicamente” su diversi livelli: dall'eliminazione di piccole mutazioni all'eliminazione di uno o più esoni. Olson ha affermato che, potenzialmente, l'editing genomico potrebbe correggere fino al 80% delle mutazioni responsabili della Duchenne. Il passo successivo è ora di testare la strategie su animali modello di taglia superiore. Intanto, Eric Olson ha fondato, insieme ad altri ricercatori, la nuovissima start-up Exonics che ha come obiettivo quello di riuscire a trasferire sull'uomo i risultati ottenuti dalla ricerca preclinica in diversi laboratori nel mondo.

## **Translarna**

**Stuart Peltz**, Chief Executive Officer di **PTC Therapeutics**, ha illustrato il lungo percorso di ricerca e sviluppo che ha portato alla commercializzazione di Translarna: il primo farmaco ad essere stato approvato in Europa per la distrofia muscolare di Duchenne. In particolare, si tratta di un trattamento per uso orale specifico per i pazienti Duchenne con una mutazione nonsense, deambulanti e con un'età dai 5 anni in su. La molecola è stata identificata in laboratorio nel 1998, nel 2004 è stata avviata la prima sperimentazione su volontari sani e si è dovuto aspettare fino al 2008 per il primo trial di fase 2 su pazienti Duchenne. Nel 2014 è poi arrivata la tanto attesa approvazione condizionale alla commercializzazione da parte della Comunità Europea e dallo scorso aprile Translarna è in commercio in Italia. Diciannove lunghi anni di cammino! Un cammino che però non è ancora concluso, Translarna è ormai disponibile in 25 Paesi nel mondo, tanti ma non sufficienti. Ad esempio, negli Stati Uniti l'approvazione per questo farmaco non è ancora arrivata dalle agenzie regolatorie competenti. Peltz ha brevemente illustrato gli studi clinici in corso nel mondo con Translarna, tra cui il **trial di fase 2** in corso negli Stati Uniti su pazienti DMD che hanno dai 2 ai 5 anni e gli **studi di estensione dei trial conclusi di fase 3** che si stanno svolgendo in diversi Paesi tra cui anche l'Italia. Risultati preliminari degli studi di estensione mostrano che Translarna ha un effetto positivo sulla funzionalità polmonare dei pazienti Duchenne non deambulanti. Oltre a lavorare sugli studi clinici a lungo termine e su studi focalizzati sul trattamento dei bambini in una fase precoce della malattia, PTC Therapeutics intende ora allargare la sua area di ricerca sulla Duchenne. Tra i futuri obiettivi della company ci sono la selezione e lo sviluppo di molecole in grado di potenziare l'effetto di Translarna, e lo sviluppo di modulatori del processo infiammatorio e della crescita muscolare.

## **Exon skipping**

Per quel che riguarda le strategie di exon skipping gli aggiornamenti sono stati illustrati da tre diverse biotech che lavorano in parallelo su questo fronte: **Wave Life Sciences**, **NS Pharma** e **Sarepta**. L'exon skipping è un approccio che sfrutta piccole molecole antisense (AON) per correggere alcune mutazioni genetiche, in particolar modo le delezioni di esoni (parti codificanti del gene), che causano un cambiamento nello schema di lettura del gene della distrofina e la mancata produzione della proteina funzionale. Il corretto schema di lettura può essere ristabilito eliminando ulteriori esoni mediante la strategia di exon skipping e alla fine di questa “operazione molecolare” la distrofina prodotta sarà più corta del normale ma potrà ancora svolgere la sua funzione

muscolare. La correzione non avviene a livello del DNA, come nel caso dell'editing genomico, ma a livello del RNA messaggero.

**Wendy Erler** di **Wave Life Sciences** ha illustrato i progressi fatti dalla biotech americana negli **studi preclinici** effettuati con gli AON **stereopuri**. Si tratta di molecole antisense di nuova generazione selezionate sulla base della loro struttura tridimensionale per ottimizzarne stabilità, specificità ed efficienza. L'AON di punta di Wave è **WVE-210201**, disegnato per lo **skipping dell'esone 51** (approccio che potrebbe essere un valido trattamento per il 13% della popolazione Duchenne). Gli studi preclinici condotti su cellule prelevate da pazienti DMD, e coltivate in laboratorio, hanno mostrato un'alta efficienza di skipping con un'elevata produzione di distrofina in maniera dose dipendente. Gli esperimenti condotti su topi modello per la distrofia muscolare hanno inoltre dimostrato che la distrofina è espressa nei vari distretti muscolari, compresi il diaframma e il cuore. Wendy Erler ha annunciato che Wave è pronta ad avviare un trial entro la fine del 2017 e che il protocollo sarà definito in collaborazione con la comunità Duchenne. Lo studio clinico includerà pazienti Duchenne sia deambulanti che non e potrà partecipare anche chi è già stato precedentemente trattato con altre strategie di exon skipping (ovviamente a seguito di un periodo di pausa rispetto al trattamento precedente). Il trial sarà condotto negli Stati Uniti e in Europa ma i particolari non sono ancora stati definiti.

A seguire, **Paula Clemens** ha presentato i dati degli studi clinici condotti da **NS Pharma**, un'azienda farmaceutica giapponese che ha sviluppato un AON di tipo morfolino di nuova generazione – denominato **NS-065/NCNP-01** – per lo **skipping dell'esone 53** (approccio che potrebbe essere un valido trattamento per l'8% della popolazione Duchenne). Un primo trial di fase 1 è stato condotto nel 2015 in Giappone su 10 pazienti DMD per valutare la sicurezza della somministrazione per via endovenosa della molecola una volta a settimana. I risultati sono stati positivi e hanno mostrato una buona efficienza di skipping con una produzione di alti livelli di distrofina. Adesso è in corso **un trial di fase 2**, in 7 diversi centri clinici negli Stati Uniti e Canada, per valutare la sicurezza, la tollerabilità, la farmacocinetica e la farmacodinamica, e l'effetto del trattamento sulla funzionalità muscolare, in un totale di 16 pazienti Duchenne, di età tra i 4 e i 9 anni, deambulanti e in trattamento stabile con steroidi. Lo studio, di tipo randomizzato e controllato con placebo, prevede la somministrazione per via endovenosa di NS-065/NCNP-01 con cadenza settimanale per 24 settimane. Il trial è diviso in due fasi, una di 4 settimane e una successiva di 20. Durante la prima fase, in doppio cieco, 8 pazienti hanno ricevuto la dose più bassa della molecola per 4 settimane. I dati preliminari sono stati elaborati a giugno e hanno dimostrato la sicurezza del trattamento. A luglio sarà quindi avviata la seconda fase dello studio clinico che sarà in aperto e prevede la somministrazione della dose più alta della molecola a tutti e 16 i pazienti per un periodo di 20 settimane. Alla fine dello studio i pazienti potranno entrare in una fase di estensione, sempre in aperto, di altre 24 settimane.

Infine, **Lisa Borland** di **Sarepta** ha illustrato gli aggiornamenti riguardo allo **studio clinico di fase 3**, denominato **ESSENCE**, progettato per valutare l'efficacia del trattamento con gli AON **SRP-4045** e **SRP-4053**, ideati per effettuare rispettivamente l'exon skipping degli esoni 45 e 53. Il trial sarà condotto su 99 pazienti Duchenne (di cui 45 trattabili con lo skipping dell'esone 45 e 45 trattabili con lo skipping dell'esone 53), deambulanti, con un'età compresa tra i 7 e i 13 anni e in trattamento stabile con steroidi. Lo studio, che sarà condotto in doppio cieco, controllato con placebo con un rapporto 2:1 (i pazienti che riceveranno il farmaco saranno il doppio di quelli che riceveranno il placebo), prevede la somministrazione per via endovenosa della molecola una volta a settimana per 2 anni. Un'analisi dei dati preliminari (analisi ad interim) è pianificata per quando i primi 75 pazienti avranno concluso il primo anno di trattamento. Questi risultati determineranno se i pazienti potranno entrare nella fase di estensione in aperto e ricevere il trattamento per altri 2 anni.

Il trial si svolgerà in 43 centri clinici tra Canada, Stati Uniti ed Europa, e i centri coinvolti in **Italia** sono: l'Istituto Gaslini di Genova, il Policlinico Universitario di Messina, l'Azienda Ospedaliera Sant'Anna di Ferrara e il Policlinico Universitario Agostino Gemelli di Roma. Una buona parte dei centri clinici hanno già avviato l'arruolamento. Borland ha infine dichiarato di non avere aggiornamenti per quello che riguarda gli altri AON, sviluppati per lo skipping di altri esoni, che Sarepta sta testando in fase preclinica.

## **Induzione dell'utrofina**

Tra i diversi approcci sperimentali per la distrofia muscolare di Duchenne vi è quello basato su molecole che modulano la produzione di utrofina, una proteina simile alla distrofina che è normalmente prodotta durante lo sviluppo fetale per poi diminuire e scomparire dopo la nascita. È stato dimostrato con studi preclinici che aumentare la produzione di utrofina può compensare la mancanza di distrofina e aiutare a recuperare la funzionalità muscolare. Questa strategia può rappresentare un valido trattamento di supporto da associare ad altri approcci terapeutici al momento in sperimentazione.

**Michelle Avery** di **Summit Therapeutics** ha illustrato gli aggiornamenti riguardo al trial **PhaseOut DMD**: uno **studio clinico di fase 2** con la molecola **ezutromid** (precedentemente nota come SMT C1100) attualmente in corso nel Regno Unito e negli Stati Uniti. Lo scorso maggio è stato completato l'arruolamento di 40 pazienti Duchenne, deambulanti, di età compresa tra i 5 e i 10 anni e in trattamento stabile con steroidi. Il trial, di tipo aperto senza placebo e che prevede la somministrazione orale di ezutromid per 48 settimane, ha come obiettivo di fornire una prova sul meccanismo di azione della molecola sperimentale mediante la valutazione di parametri relativi allo "stato di salute" dei muscoli e alla funzionalità muscolare. I risultati delle analisi ad interim riguardo alle biopsie a 24 settimane provenienti da 20 pazienti, alle MRI a 24 settimane e ai dati funzionali relativi a tutti i 40 pazienti arruolati nel trial, dovrebbero essere disponibili entro il primo trimestre del 2018. Qualora i risultati preliminari fossero incoraggianti, Summit Therapeutics prevede di pianificare uno studio di fase 3 controllato con placebo.

**Justin Fallon** dell'azienda biofarmaceutica americana **Tivorsan** ha invece presentato i risultati ottenuti con la molecola **TVN-102**, una forma ricombinante del biglicano umano (una proteina normalmente presente nel muscolo che agisce regolando l'espressione dell'utrofina) per la quale sono in fase di conclusione gli studi preclinici. Negli ultimi anni, Tivorsan ha sviluppato una formulazione ottimizzata della molecola adatta all'utilizzo nell'uomo e ha ottenuto buoni risultati negli esperimenti condotti su topi modello per la distrofia muscolare e in cellule muscolari prelevate da pazienti DMD. I dati mostrano che TVN-102 induce un importante incremento di utrofina con la formazione di un complesso proteico funzionale a livello della membrana delle cellule muscolari, a questo si associa un miglioramento della struttura muscolare nei topi. È stato inoltre dimostrato che con la somministrazione per via sistemica TVN-102 raggiunge sia i distretti dei muscoli scheletrici che il tessuto cardiaco. Tivorsan sta pianificando l'avvio di uno studio clinico entro la prima metà del 2018. Al momento i dettagli del futuro trial non sono noti.