

# *Atro grande Progetto di Terapia Genica*



**Meeting  
4-5 ottobre 2021  
Perugia  
Santa Maria degli Angeli**

**MEETING MALATTIA DI LAFORA (ML)**

**MARTEDI' 5 OTTOBRE 2021, SANTA MARIA DEGLI ANGELI**

**ATTI DELLA TAVOLA ROTONDA**

**PARTECIPANTI:** Margherita Gatti, Anna Albarello, Giuseppe Baschiroto, Berge Minassian, Matthew Gentry, Marina Sanchez, Alessandro Aiuti (da remoto), Pasquale Striano, Federico Zara, Francesca Bisulli, Alberto Verrotti, Giuseppe Damante, Gabriele Costantino, Roberto Michelucci, Paolo Prontera.

## **1. Terapia Genica e tecnologia CRISPR/cas9: migliori opzioni, problematiche tecniche, stato dei lavori**

La tavola rotonda si apre con la discussione sulle prospettive di terapia genica per la ML. Il Prof. Aiuti concorda con il Prof. Minassian circa la non proponibilità di una terapia genica ex-vivo, ossia mediante il prelievo e successivo trattamento di cellule ematopoietiche da re infondere nel paziente una volta ingegnerizzate con il gene (EPM2A o EPM2B) mancante. Le cellule ematiche infatti, globuli bianchi in particolare, arriverebbero al sistema nervoso centrale, superando quindi la barriera ematoencefalica, ma la proteina (laforina o malina) prodotta al loro interno non sarebbe in grado di raggiungere il glicogeno anomalo accumulato nel citosol del neurone.

Appare quindi, secondo il Prof. Minassian, da percorrere la strada di una terapia genica in-vivo, ossia utilizzando vettori virali, del tipo Adeno-Associati, per trasportare il gene mancante fino al bersaglio, il neurone, l'astrocita in particolare, dato che il 90% circa del glicogeno si accumula in questa particolare cellula nervosa. Il gruppo del Prof. Minassian ha completato gli esperimenti di terapia genica in-situ (su cellule in coltura, in laboratorio) e si accinge quindi a passare alla sperimentazione sul modello murino. Una delle problematiche che intravede il Prof. Minassian è l'enorme numero di cellule nervose che si dovranno raggiungere per avere un effetto terapeutico, per questo saranno importanti i dati che verranno raccolti non tanto sul topo quanto sui primati non umani, che hanno un cervello di dimensioni paragonabili a quello umano. La via di somministrazione per la terapia genica sarà quella intratecale.

Vi è molto interesse da parte del Prof. Minassian e del Prof. Aiuti ad approfondire le rispettive linee di ricerca ed i due ricercatori si salutano quando il Prof. Aiuti deve lasciare il collegamento, promettendosi di portare avanti la discussione e le interazioni.

Il Prof. Damante introduce il tema della tecnologia CRISPR/cas9, in breve un sistema noto come "taglia e cuci" del DNA ossia in grado di eseguire delle riparazioni chirurgiche andando a sostituire un frammento di DNA mutato con una sequenza di DNA "normale". Questo appare un campo ancora più sperimentale della terapia genica ma di sicuro interesse. Nel caso della ML una problematica è l'eterogeneità genetica, ossia ogni paziente ha una o due mutazioni differenti e ne consegue che la terapia andrebbe disegnata personalmente per ogni singolo paziente, a differenza della terapia genica che risulterebbe utile per trattare ogni tipo di mutazione. La Prof.ssa Sanchez ricorda che avendo sviluppato nel loro laboratorio un modello murino portatore di una specifica mutazione, questo bene si presterebbe a degli esperimenti per correggere l'errore genetico in-vivo, mediante la tecnologia "taglia e cuci". Il Dr. Prontera si inserisce nella discussione proponendo una collaborazione tra la Dr.ssa Sanchez e l'Ospedale e l'Università di Perugia, nello specifico con la Dr.ssa Cinzia Costa, in quanto in condizione di accogliere nello stabulario i modelli murini mutati. La Dr.ssa Costa aveva già discusso in mattinata con la Dr.ssa Sanchez circa la possibilità di studiare la plasticità neuronale

dei modelli murini mutati a seguito del trattamento con metformina o altre piccole molecole che inibiscono la glicogeno sintasi. Il Prof. Damante, in seguito, si dirà d'accordo nel procedere con uno studio che includa anche la tecnologia CRISPR/cas9, in collaborazione con il Dr. Prontera e la Dr.ssa Costa.

## **2. ASO e Terapie Enzimatiche**

Il Prof. Gentry espone nuovamente i risultati incoraggianti del VAL-0417 e VAL-1221 come enzimi di efficacia maggiore rispetto ad altri sviluppati per il trattamento delle Glicogenosi, in quanto in grado di penetrare nel citosol e degradare il glicogeno anomalo in questa sede, a differenza di altre sostanze che sarebbero state sviluppate per lo più per raggiungere il lisosoma. Dato che il VAL-1221 viene utilizzato con infusioni endovena per il trattamento della Malattia di Pompe l'ostacolo maggiore viene dall'incapacità di questo enzima, di grandi dimensioni, di superare la barriera ematoencefalica. Una strategia promettente per "aprire" un varco nella barriera viene da recenti studi che utilizzano gli ultrasuoni in associazione con microsferiche che, localizzati in specifiche aree cerebrali, sarebbero in grado di aumentare la permeabilità della barriera così da permettere il passaggio di molecole di maggiori dimensioni. Il Prof. Minassian interviene per aggiungere che questa tipologia di esperimenti verrà portata avanti presso il suo laboratorio per ora sul modello murino. La tecnologia degli ultrasuoni assieme all'utilizzo del VAL-1221 appare come una strada promettente e di cui seguirne gli sviluppi.

Per quanto riguarda gli ASO il Prof. Minassian spiega, come farà poi nel pomeriggio anche durante l'incontro con i genitori, di come la questione sia in questo momento in mano a IONIS, la casa farmaceutica che ne detiene il brevetto, e si augura ovviamente che possano entrare il prossimo anno nella sperimentazione clinica sull'uomo. Alla domanda se sarà previsto un gruppo di pazienti da trattare con placebo oppure se si potrà usare la storia naturale, il Prof. Minassian spiega come nella Lafora abbia una lenta progressione, mentre in altre malattie il peggioramento è sempre repentino e quindi la storia naturale può essere utilizzata perché appare evidente l'eventuale beneficio esercitato dal farmaco. Per questo si teme che gli organi regolatori (FDA, EMA) non possano valutare l'effettiva efficacia del trattamento in assenza di uno studio caso-controllo.

Il Dr. Prontera chiede se ASO ed enzimi possano un giorno essere utilizzati nello stesso paziente. D'altra parte ci sono tanti pazienti che utilizzano politerapie (pensiamo ai pazienti oncologici). Sia il Prof. Gentry che il Prof. Minassian poi concordano sulla possibilità che, in futuro, una volta approvate entrambe le terapie, quella ad oligonucleotidi antisenso (ASO) e quella enzimatica, possano essere utilizzate contestualmente, d'altra parte esse agiscono su meccanismi diversi, la prima nel bloccare la progressione della malattia, la seconda degradando i corpi di Lafora già formati.

Il Prof. Minassian, facendo riferimento al gruppo dell'Ospedale Bellaria e dell'IRCCS Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna, rappresentati nella tavola rotonda dal Dr. Michelucci e dalla Prof.ssa Bisulli, tiene a precisare che il lavoro dei clinici e dei ricercatori che stanno seguendo i pazienti, che li stanno curando in modo sintomatico, monitorando, che ne stanno descrivendo la storia naturale, è fondamentale per la buona riuscita del trial clinico.

La giornata continua con una discussione che viene animata dal Prof. Costantino, dal Prof. Verrotti, dal Prof. Zara e dal Dr. Striano su vari temi, clinici e farmacologici, e si conclude con l'intervento di Anna Albarello e Giuseppe Baschiroto che ribadiscono la necessità di essere rapidi, soprattutto con gli esperimenti che possono avvicinare i trattamenti nel più breve tempo possibile e sottolineando come, seppure appare come una strada più lunga, ritengano doveroso incentivare la ricerca nell'ambito della terapia genica.

Anna Albarello inoltre solleva l'importanza della terapia compassionevole per ragazzi sintomatici, qualora venissero approvati i trial clinici di terapie sperimentali. Minassian risponde che le aziende farmaceutiche scelgono i criteri di inclusioni e solitamente non includono queste tipologie di pazienti perché temono che vengano falsati i risultati e che poi non sia messo in commercio il Farmaco. Anna chiede allora se le aziende decidono da sole i criteri di inclusione o chiedono anche il parere degli altri scienziati e Minassian risponde che viene chiesto anche il loro parere ma che questo non è vincolante.

La giornata si conclude con l'impegno da parte dell'Associazione Malattie Rare Mauro Baschiroto di promuovere un bando di ricerca internazionale per la Terapia Genica nella Malattia di Lafora che vedrà un premio di 100.000 euro per il progetto più promettente.