

Milano, 14 ottobre 2011

Aggiornamento anno 2011:

Terapia genica in modelli murini transgenici della Atrofia Muscolare Spinale (SMA)

Premessa. Questo progetto di ricerca nasce dalla necessità di trovare a breve una terapia per la SMA. Dopo la nostra scoperta della proteina a-SMN, o SMN assonale (in collaborazione con il Laboratorio di Biologia Molecolare diretto da Enrico Garattini all’ Istituto di Ricerche Farmacologiche “Mario Negri” di Milano), abbiamo intrapreso un progetto di terapia genica in topi transgenici SMA, per somministrare entrambe le proteine SMN, ossia la proteina FL-SMN (proteina SMN “intera”, scoperta nel 1995 insieme al gene SMN) e la proteina a-SMN (SMN assonale, scoperta da noi nel 2007).

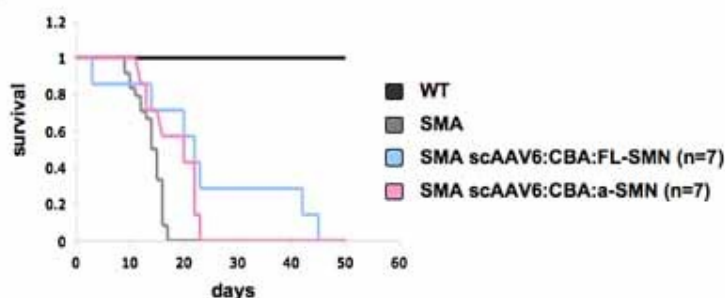
Risultati. La prima parte del programma è stata svolta in collaborazione con il laboratorio del prof. Patrick Aebischer presso lo Swiss Federal Institute of Technology (EPFL) di Losanna (dr.ssa Veronica Setola, dr. Chris Towne). Questa collaborazione ha portato una serie di dati sperimentali riguardanti la modalità di somministrazione ed il sierotipo dei virus AAV (virus adeno-associati). La scelta degli adeno-associati è stata determinata dalla necessità di una terapia genica non pericolosa per un futuro trattamento dei pazienti: infatti i virus adeno-associati non hanno il rischio di attivare o disattivare la trascrizione di geni importanti o potenzialmente pericolosi per i pazienti trattati in quanto non si integrano nel genoma delle cellule ospiti.

La strategia iniziale è stata quella di iniettare i virus esprimenti le proteine di interesse (FL-SMN e a-SMN) per via intramuscolare. Questa strategia si è rivelata molto efficace per far esprimere i virus in modo selettivo nei motoneuroni, ma non ha prodotto effetti significativi sul fenotipo clinico dei topi sia di tipo SMA II (a livello di sopravvivenza) che SMA III (a livello di modifiche del pattern EMGrafico). E’ stata pertanto cambiata la strategia sperimentale, con **i**) la produzione di nuovi virus scAAV6 (self-complementary AAV6) in grado di produrre maggiori quantità di proteina FL-SMN e a-SMN, **ii**) l’ utilizzo di diverse vie di somministrazione, intracerebro-ventricolare e sistemica (endovenosa), al secondo giorno di vita post-

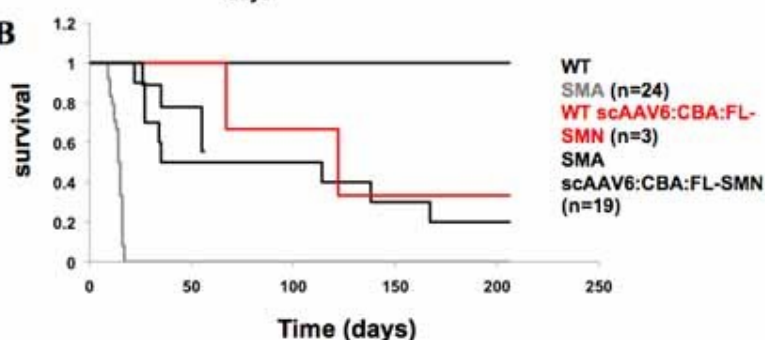
natale. Gli esperimenti sono stati concentrati soprattutto sui topi *Smn^{-/-}/delta7*, o topi SMA II, che hanno una sopravvivenza media di due settimane dopo la nascita. L'utilizzo di diversi sierotipi di virus AAV (AAV6; AAV8; AAV9) ha dimostrato che gli AAV6 sono i virus che posseggono un più evidente tropismo per le cellule neuronali e per i motoneuroni in particolare. Gli esperimenti sono stati quindi effettuati con questo sierotipo virale. Come dimostrato nei grafici seguenti, le curve di sopravvivenza dimostrano che entrambe le proteine sono efficaci per aumentare la sopravvivenza dei topi SMA delta7, anche se i risultati del trattamento sono stati diversi per le due proteine.

Fig. 1

A



B



Infatti, il trattamento con singola somministrazione al secondo giorno di vita sia con scAAV6-FL-SMN che con scAAV6-a-SMN ha determinato una estensione della sopravvivenza dei topi SMA delta7, ma la sopravvivenza dei topi trattati con scAAV6-FL-SMN si è rivelata maggiore (da 15 a 45 giorni per scAAV6-FL-SMN; da 15 a 23 giorni di sopravvivenza massima per scAAV6-a-SMN, Fig. 1A – in grigio, topi SMA non trattati; in rosa, topi SMA trattati con scAAV6-a-SMN; in blu, topi SMA trattati con scAAV6-FL-SMN). E' stata quindi utilizzata una dose maggiore di virus scAAV6-FL-SMN per verificare una ulteriore efficacia della terapia genica. La singola somministrazione di una dose maggiore di virus ha determinato un aumento della sopravvivenza fino ad oltre i 200 giorni in alcuni animali trattati (Fig. 1B – in grigio, topi SMA non trattati; in rosso, topi wild type trattati con scAAV6-FL-SMN; in nero, topi SMA trattati con scAAV6-FL-SMN). Tuttavia, deve essere segnalato che dopo un certo periodo di sopravvivenza tutti i topi manifestavano problemi di necrosi periferica (in particolare a livello della coda, dei padiglioni auricolari, e delle estremità degli arti), condizione già segnalata in precedenti lavori su questo particolare modello animale. Al momento attuale, quindi, la terapia sembra essere promettente ed efficace ma non ancora ottimale.

Sviluppi futuri. Poiché i nostri dati hanno dimostrato: **I)** l'efficacia di questo approccio di terapia genica per quanto riguarda il periodo di sopravvivenza degli animali; **II)** il non completo benessere degli animali trattati; **III)** l'efficacia parziale di a-SMN rispetto a FL-SMN, ci proponiamo di un ulteriore sviluppo della nostra terapia: **A)** somministrando contemporaneamente in topi SMA delta7 entrambe le proteine, sia a-SMN che FL-SMN, per valutare se le due proteine possano esercitare un effetto sinergico nell'animale in vivo; **B)** modificando ulteriormente la via di somministrazione (da intracerebroventricolare ad endovenosa), e il sierotipo dei virus da AAV6 a AAV9. Questi sierotipo, infatti, oltre a superare la barriera emato-encefalica se somministrato per via endovenosa, e raggiunge titolazioni virali (e quindi produzione di proteina) maggiori rispetto ai virus AAV6 fino ad ora utilizzati. La via di somministrazione endovenosa è ulteriormente supportata da dati recenti di letteratura che suggeriscono che la SMA non è una patologia che colpisce solo il sistema nervoso centrale (e i motoneuroni in particolare), ma che può interessare altri organi e sistemi, dato che in alcuni pazienti sono stati riscontrati necrosi periferiche, disfunzioni cardiache, e diabete mellito. Anche la maggioranza dei gruppi che lavorano sulla SMA preferiscono attualmente la somministrazione per via sistemica.

Questa nuova fase del progetto, per ragioni geografiche e di convenienza operativa, sarà svolta completamente in Italia, a Milano e Torino. Recentemente, come anche già comunicato alla Associazione Girotondo, è stato finanziato da parte del Ministero della Salute il progetto RF-2009-1473235 "*Motor neuron death in Spinal Muscular Atrophy (SMA): new animal models and innovative therapeutic strategies*" (progetto coordinato da Giorgio Battaglia), per un importo di circa 525.000 Euro per un periodo di tre anni, che coinvolge anche i gruppi diretti da Alessandro Vercelli e Ferdinando Di Cunto a Torino, e che prevede in modo specifico il finanziamento parziale degli esperimenti di terapia genica. Il gruppo svizzero di Patrick Aebischer assicurerà comunque la produzione dei costrutti "self-complementary", mentre la produzione e la titolazione dei virus sarà effettuata a Torino, e il trattamento degli animali a Milano. E' già stato avviato il protocollo di produzione dei virus in collaborazione con Ferdinando Di Cunto, Guido Tarone, ed Emilia Turco al Centro di Biotecnologie Molecolari dell'Università di Torino, per la produzione di un nuovo sierotipo di virus scAAV9 esprimenti le proteine FL-SMN e a-SMN.

Giorgio Stefano Battaglia, MD
Responsabile, SOSD di Neuroanatomia e Patogenesi Molecolare
Fondazione IRCCS Istituto Neurologico "C. Besta"
Via Temolo 4, 20126 Milano, Italia
Via Celoria 11, 20133 Milano, Italia
tel: ++ 39 02 23942606
fax: ++ 39 02 23942619