

## **Lo stato attuale della ricerca sull'atrofia muscolare spinale**

### **Introduzione**

L'atrofia muscolare spinale (SMA) è una malattia autosomica recessiva ed è la principale causa di mortalità infantile ereditaria. Nel 1995, la scoperta del gene che causa la malattia ha fornito la capacità di diagnosticare la SMA con un semplice esame del sangue. Questo ha migliorato la possibilità di diagnosi precoce e portato a standard di cura per i pazienti. Inoltre questa scoperta ha innescato un periodo di rapidi progressi nella comprensione delle basi molecolari e cellulari della malattia. Questo ha portato all'identificazione di bersagli terapeutici e allo sviluppo di modelli animali SMA, che possono ora essere utilizzati nelle indagini precliniche. Di conseguenza lo sviluppo di terapie per la SMA ha ora forti basi accademiche, governative ed industriali, con il coinvolgimento di aziende come Trophos, Repligen Corporation, California Stem Cell, ISIS Pharmaceuticals, Genzyme Corporation, Paratek Pharmaceuticals, PTC Therapeutics, Novartis Pharmaceuticals, e Merck & Co., e l'investimento di tempo e denaro nella ricerca di base e clinica. Mentre gli studi clinici con farmaci riproposti sono stati recentemente completati nei pazienti SMA, l'approvazione da parte della FDA del trial clinico di fase I sponsorizzato da Repligen rappresenta la prima volta che un farmaco sviluppato esclusivamente per il trattamento della SMA entra negli studi clinici. La promessa di una cura per questa devastante malattia neuromuscolare non è mai stata così grande.

### **Genetica della SMA**

Il gene che causa la malattia è stato mappato in una regione del cromosoma 5 che contiene una duplicazione invertita. I ricercatori hanno documentato che le mutazioni in uno dei geni di questo settore, l'SMN1, causa la SMA. Queste mutazioni sono di solito delezioni omozigoti degli esoni 6-8; tuttavia mutazioni frameshift, missenso e nonsenso SMN1 possono anche causare la SMA. Una copia centromerica duplicata e invertita di questo gene, l'SMN2, è presente nel 90-95% della popolazione normale e in tutti i pazienti affetti da SMA. L'unica differenza funzionale tra i due geni sembra essere una transizione CT in posizione 6 nell'esone 7 in SMN2, che si trova all'interno di un enhancer esonico e porta all'eliminazione dell'esone 7 durante la trascrizione di SMN2 di derivazione pre-RNA. Il trascritto mRNA risultante, carente dell'esone 7 (SMN $\Delta$ 7), codifica una proteina troncata che viene rapidamente degradata, ma una piccola quantità di trascritto derivante dal gene SMN2 è integro e codifica per la proteina SMN di lunghezza completa. La SMA è dunque causata da ridotti livelli di espressione della proteina SMN. La capacità del gene SMN2 di codificare correttamente la proteina SMN funzionale in assenza del gene SMN1 gioca un ruolo fondamentale nel modificare il fenotipo dei pazienti SMA. Esiste una relazione inversa tra numero di copie di SMN2 e la gravità della malattia; i pazienti SMA I hanno una o due copie SMN2, la maggior parte dei pazienti SMA di tipo II ne hanno tre copie, mentre la maggior parte dei pazienti SMA di tipo III hanno 3 o 4 copie SMN2. Sono stati osservati alcuni individui che mancano del gene SMN1 e posseggono 5 copie del gene SMN2: non presentano sintomi di SMA, ciò indicando che un'adeguata attività SMN2 può prevenire la malattia. Questa osservazione, insieme ad osservazioni simili nei topi, ha fatto in modo che la maggior parte degli sforzi nello sviluppo di terapie SMA si focalizzassero sull'individuazione di strategie per aumentare i livelli SMN.

### **Strategie terapeutiche**

Poiché i livelli di espressione SMN correlano con la gravità della malattia negli esseri umani e nei topi e l'induzione postnatale dell'espressione SMN nei topi è sufficiente a prevenire la malattia, l'obiettivo principale dello sviluppo terapeutico per la SMA è stato quello di individuare strategie per aumentare i livelli di proteina SMN: mediante l'attivazione dell'espressione del gene SMN2, aumentando l'inclusione dell'esone 7 in trascritti SMN2, stabilizzando la proteina SMN o sostituendo il gene SMN1. Altri sforzi si sono concentrati sulla neuroprotezione e sulla sostituzione delle cellule.

## **Attivazione dell'espressione genica SMN2**

*Farmaci riproposti: inibitori della deacetilasi istonica (HDAC), idrossiurea e prolattina*

Gli HDAC attivano l'espressione genica inibendo la deacetilasi istonica e in tal modo promuovendo la trascrizione di regioni trascrizionalmente represses della cromatina. Il gene SMN2 può essere attivato da una piccola molecola, il butirrato di sodio. Altri inibitori, tra cui l'acido valproico (VPA), il fenilbutirrato, la tricostatina A (TSA) e l'acido idrossamicico suberoilammina (SAHA) hanno dimostrato di incrementare l'espressione SMN2 in linee cellulari derivate da pazienti e in modelli animali. Questa classe di farmaci è stata anche la prima a dimostrare la capacità di migliorare sensibilmente il fenotipo dei topi SMA con TSA e SAHA aumentando la sopravvivenza mediana del 40% e del 30%, rispettivamente, in diversi modelli murini SMA. Siccome VPA e fenilbutirrato sono di uso clinico per altre indicazioni, sono stati entrambi utilizzati in tempi brevi per studi clinici nei pazienti SMA, nonostante il loro basso potenziale come HDAC. Recenti risultati di questi studi nella SMA di tipo II e III hanno mostrato poco o nessun effetto. Studi con questi composti sono in corso su neonati con SMA I in quanto la loro efficacia potrebbe essere migliorata con la somministrazione precoce. Sono inoltre in corso di identificazione altri più potenti inibitori HDAC, penetranti il sistema nervoso centrale e specifici per la SMA. L'identificazione di farmaci privi di alta tossicità per l'uso cronico è la sfida più impegnativa per tale classe di composti.

L'idrossiurea ha mostrato di aumentare il rapporto tra proteina SMN completa e troncata in linee cellulari derivate da pazienti SMA, forse attraverso l'attivazione dell'ossido nitrico. L'idrossiurea è stata anche utilizzata in studi clinici su pazienti SMA in quanto approvata dalla FDA per il trattamento dell'anemia falciforme. Nonostante precedenti lavori che documentano modesti miglioramenti nel punteggio del test muscolare manuale (MMT), uno studio in doppio cieco con placebo è stato recentemente pubblicato, non mostrando miglioramenti nella funzione motoria o nei livelli di SMN completa in pazienti di tipo SMA II e III dopo il trattamento con idrossiurea.

Due gruppi di ricercatori hanno recentemente coinvolto Stat5 quale regolatore dell'espressione SMN. Stat5 è stato identificato come un target di tre composti in grado di promuovere l'attività di SMN2: TSA, aclarubicina e vanadato sodico. Ancora più recentemente, la prolattina, un noto attivatore Stat5, ha mostrato di aumentare la durata della vita media dei topi SMA da 14 a 21 giorni. La prolattina ricombinante è approvata dalla FDA per il trattamento del deficit di prolattina nelle donne e potrebbe dunque essere disponibile per la ricerca in studi clinici SMA. Non è chiaro, tuttavia, se la dose di prolattina ricombinante tipicamente utilizzata nella pratica clinica sarà sufficiente per attivare SMN2 nei pazienti SMA.

*Derivati chinazoline*

Derivati delle chinazoline erano emersi quali promotori dell'attività SMN2 in uno screening di oltre 500.000 composti su test cellulare. In uno screening secondario, fu provato l'aumento dei livelli di proteina SMN e del numero di "gems" in fibroblasti derivati da pazienti SMA. Dopo gli studi di struttura e l'ottimizzazione, è stato identificato un nuovo derivato 2,4-diamminochinazoline, con una buona penetrazione del sistema nervoso centrale e una lunga emivita dopo somministrazione per via orale nei topi. Questi composti sono stati descritti per essere potenti inibitori del DcpS, un enzima spazzino per la degradazione dell'mRNA. Inoltre, questo enzima svolge un ruolo nel meccanismo di splicing. Il composto è stato testato in vivo ed è stato dimostrato produrre moderati benefici nel modello murino SMA grave. Studi clinici di fase I con questo composto sono stati avviati dalla compagnia Repligen. Il meccanismo dettagliato attraverso il quale l'inibizione di DcpS porta all'attivazione di SMN2 e ai benefici nei topi SMA resta sotto studio.

## **Modulazione dello splicing**

*Farmaci riproposti: salbutamolo*

Il salbutamolo (albuterolo) ha dimostrato di aumentare i livelli di SMN completa in linee cellulari derivate da pazienti SMA. Due studi clinici pilota nella SMA di tipo II e III indicano un modesto miglioramento della funzione motoria per periodi di 6-12 mesi. Il farmaco è stato ben tollerato.

Studi più grandi e controllati con placebo sono necessari per valutare ulteriormente l'efficacia di questo farmaco nella SMA.

#### *Piccole molecole*

Nel 2001 i ricercatori hanno scoperto che l'aclarubicina aumentava i livelli di proteina SMN e il numero di "gems" in fibroblasti SMA, aumentando l'inclusione dell'esone 7. Purtroppo questo composto ha effetti tossici proibitivi nell'uso a lungo termine, come sarebbe probabilmente necessario per i pazienti SMA. In base alla loro somiglianza strutturale con l'aclarubicina, derivati della tetraciclina della biblioteca chimica farmaceutica proprietaria Paratek Pharmaceuticals sono stati recentemente individuati mediante test cellulari: un derivato, denominato PTK-SMA1, è stato provato aumentare la quantità di inclusione dell'esone 7. PTK-SMA1 non modifica i modelli di splicing di altri geni testati, suggerendo un effetto specifico proprio sullo splicing dell'esone 7 SMN piuttosto che un effetto globale. PTK-SMA1 ha anche aumentato l'inclusione dell'esone 7 dopo somministrazione a un modello murino SMA lieve, quindi con convalida in vivo.

PTC Therapeutics, una società focalizzata sullo sviluppo di farmaci che agiscono sul controllo post-trascrizionale dell'espressione genica, ha identificato recentemente composti che aumentano l'inclusione dell'esone 7, aumentando così l'espressione della proteina SMN. Sono state identificate tre diverse molecole che aumentano i livelli SMN e prolungano la sopravvivenza media di topi SMA gravi, in un caso da 14 a 132 giorni. Questi composti sono biodisponibili per via orale e possono penetrare la barriera emato-encefalica, ma il meccanismo con cui essi alterano lo splicing SMN non è stato ancora descritto.

#### *Oligonucleotidi antisense*

Un'altra strategia adottata per aumentare l'inclusione dell'esone 7 è l'utilizzo di oligonucleotidi antisense (ASO), nucleotidi modificati che si legano a sequenze di mRNA specifiche. Questa associazione può promuovere la degradazione di un mRNA specifico o, nel caso di terapie SMA, creare specifiche sequenze regolatorie in grado di promuovere l'inclusione dell'esone 7. Varie sequenze di mRNA SMN2 sono state utilizzate con le molecole più efficaci; ASO diversi sono stati studiati in modelli cellulari e animali. ISIS Pharmaceuticals ha sviluppato una molecola (ASO-10-27 o ISIS-SMNRx) in grado di correggere le necrosi della coda e delle orecchie nel modello murino SMA lieve e di estendere la sopravvivenza media nei topi SMA gravi da 16 a 26 giorni. Ciò in collaborazione con il laboratorio del dott. Adrian Krainer e di Genzyme. Sono stati documentati anche livelli terapeutici di ASO nel midollo spinale di scimmie dopo iniezione intratecale. Inoltre dati recenti mostrano un beneficio ancora più evidente se il potenziale farmaco è somministrato per via sistemica nei topi SMA gravi, con alcuni topi sopravvissuti per più di 1 anno. Il beneficio maggiore con la somministrazione sistemica suggerisce la necessità di ripristinare SMN in altri tessuti oltre che nel sistema nervoso centrale. Se questo è rilevante per la malattia umana è ancora da determinare. ISIS Pharmaceuticals prevede di presentare nei prossimi mesi richiesta di autorizzazione alla FDA, con l'obiettivo di iniziare un trial di fase 1 nei pazienti SMA questo inverno con un singola iniezione intratecale di ISIS-SMNRx.

### **Modulazione proteica**

#### *Farmaci riproposti: aminoglicosidi e inibitori del proteasoma*

Gli aminoglicosidi sono noti per la loro capacità di indurre la traduzione oltre i codoni di stop. Nel caso del gene SMN2, è stata postulata la possibilità di estendere la lunghezza della proteina SMN troncata, migliorando così la sua stabilità. Gli aminoglicosidi aumentano il numero di gems e i livelli di proteina SMN in fibroblasti derivati da pazienti SMA; la geneticina (un aminoglicoside) migliora la funzione motoria ma non la sopravvivenza nei topi SMA, con qualche evidenza di tossicità. Al contrario, un nuovo aminoglicoside, il TC007, ha fornito un aumento del 30% nella sopravvivenza di topi SMA gravi.

Recentemente è stato dimostrato che il farmaco inibitore del proteasoma bortezomib (già approvato dalla FDA) aumenta i livelli di proteina SMN nei muscoli e altri tessuti periferici, ma non nel sistema nervoso centrale nel modello murino SMA grave. Se combinato con TSA, che è un

penetrante del sistema nervoso centrale, c'è stato un miglioramento nella sopravvivenza dei topi SMA migliore di quello osservato con TSA soltanto. Questi dati forniscono la prova che l'inibizione della degradazione della proteina SMN può ridurre la gravità della malattia. Tuttavia, entrambi gli aminoglicosidi e inibitori del proteasoma dovranno superare l'ostacolo della tossicità prima di poter essere utilizzati sui pazienti SMA.

#### *Il Progetto SMA*

Nel 2003, il National Institute of Neurological Disorders and Strokes (NINDS) ha fondato il Progetto SMA, un'iniziativa di ricerca con sede e direzione presso le strutture sanitarie governative statunitensi. E' la prima volta che l'Istituto di Sanità americano intraprende una simile iniziativa per una particolare malattia, con l'obiettivo di sviluppare un possibile farmaco specifico entro 5 anni. Il Progetto SMA ha attualmente due serie di composti in fase di sviluppo. La prima, derivati dell'indoprofene, si basa sull'osservazione che l'indoprofene aumenta i livelli di SMN e il numero di gems in fibroblasti derivati da pazienti SMA e fornisce un modesto beneficio di sopravvivenza di embrioni di topo SMA. La seconda serie di composti, circa 200 benzimidazoli, è stata generata in maniera indipendente da screening ad ampio spettro.

#### **Terapia genica**

La terapia genica offre l'opportunità di ripristinare la normale presenza del gene SMN1 nei pazienti SMA; tuttavia l'effettivo trasporto del gene in una cellula di difficile accesso come il motoneurone è stato considerato fino a poco tempo fa una sfida quasi impossibile. Diversi gruppi hanno infine compiuto questo passo utilizzando vettori virali adeno-associati. In particolare gli AAV9 hanno dimostrato di essere i più adatti, quando iniettati per via intravascolare. Questi virus hanno dimostrato migliorare notevolmente il fenotipo SMA dopo la somministrazione postnatale precoce nei topi SMA gravi, fino a 157-250 giorni a seconda se la somministrazione avvenga per via endovenosa o intracerebroventricolare. Recentemente sono stati effettuati dei test anche sulle scimmie, fornendo la prova che il virus è in grado di trasferire il gene in modo efficiente nel sistema nervoso centrale di un primate non umano di grandi dimensioni. Gli studi preclinici sono in corso per affrontare le sfide della potenziale tossicità, del trasferimento genico e della produzione per studi clinici sull'uomo.

#### **Neuroprotezione**

##### *Farmaci riproposti: riluzolo e ceftriaxone*

Il riluzolo è un farmaco approvato dalla FDA per il trattamento della sclerosi laterale amiotrofica (SLA) e vi è interesse a valutarlo per l'efficacia nella SMA. Uno studio clinico di fase I ha mostrato che il riluzolo può essere impiegato con sicurezza su pazienti di tipo SMA I; un recente lavoro ha indicato che questo composto ha proprietà farmacocinetiche nei pazienti SMA analoghe a quelle osservate nei pazienti affetti da SLA.

L'antibiotico ceftriaxone è stato dimostrato migliorare il fenotipo dei topi SLA. Di conseguenza uno studio clinico con il ceftriaxone è in corso in pazienti affetti da SLA. Questo farmaco è stato valutato anche in topi SMA gravi, dimostrando di prolungarne modestamente la sopravvivenza.

##### *Olesoxime*

Un nuovo composto neuroprotettivo in fase di studio per il trattamento delle malattie neurodegenerative come la SLA e la SMA è l'olesoxime (TRO19622), una sostanza simile al colesterolo sviluppata dalla francese Trophos. Questo farmaco è stato identificato attraverso uno screening cellulare per i composti che proteggono i motoneuroni primari di ratto dalla degenerazione indotta dalla mancanza di fattore trofico. Sebbene i meccanismi non sono ancora del tutto chiari, il farmaco ha dimostrato di legarsi a proteine situate sulla membrana esterna mitocondriale, suggerendo un ruolo di segnalazione mitocondriale nel meccanismo d'azione del farmaco. Il reclutamento per uno studio clinico di fase II nei pazienti SMA è stato recentemente completato.

## **Sostituzione cellulare**

Un'altra strategia di trattamento che viene attivamente studiata nella SMA è la sostituzione delle cellule nervose degenerate o perdute. Cellule staminali embrionali possono essere differenziate in cellule staminali neurali e poi in motoneuroni funzionali sotto certe condizioni di differenziazione che di solito coinvolgono l'acido retinoico e fattori neurotrofici. Sono stati riportati benefici in vivo da iniezioni intratecali di cellule staminali neurali in topi SMA gravi. Topi SMA trattati con queste cellule staminali neurali presentano un aumento della sopravvivenza e benefici nella funzionalità motoria, così come un aumento del numero e delle dimensioni dei motoneuroni nel midollo spinale. Il lavoro di California Stem Cell ha di recente portato allo sviluppo di nuovi metodi per creare cellule neuronali progenitrici umane di elevata purezza. La capacità di produrle su larga scala è fondamentale per lo sviluppo di queste cellule come potenziale terapia. Questo gruppo ha anche dimostrato benefici fenotipici in modelli animali di SLA, SMA e lesioni del midollo spinale, convalidando ulteriormente le potenzialità di questa terapia. Uno studio di fase I è in attesa di essere approvato dalla FDA quale possibile trattamento per pazienti SMA I.

## **Ricerche in corso**

Ci sono molte iniziative in corso per identificare altri nuovi farmaci per la SMA. Queste includono anche attività di screening ad alta velocità da parte di Novartis e Merck, in collaborazione con il dott. Gideon Dreyfuss. Ultimamente sono stati identificati numerosi composti SMN-inducenti nel corso di uno screening su oltre un milione di piccole molecole testate su cellule derivate da pazienti SMA; i migliori sono in corso di ottimizzazione e i loro meccanismi di azione stanno per essere caratterizzati.

Due ulteriori studi recenti evidenziano l'utilità di nuovi test di screening. Il gruppo del dott. Lee Rubin presso l'Harvard Stem Cell Institute utilizza un nuovo metodo basato su immagini che identificano l'aumento del numero di gems, della loro intensità ed i livelli di SMN indipendentemente dalla posizione cellulare. I ricercatori sono stati in grado di fornire la prova del coinvolgimento di GSK-3-chinasi quale regolatore della proteina SMN. Il gruppo del dott. Elliot Androphy ha creato un nuovo test di screening basato sulla luciferasi che permette la rilevazione in base ad aumenti dell'attività di promotore SMN2, aumenti dell'inclusione dell'esone 7 e/o stabilizzazione della proteina SMN. In uno screening primario di oltre 200.000 composti, oltre 6.000 composti sono stati inizialmente identificati. Dopo l'eliminazione di molti composti non specifici, 21 di essi sono stati sottoposti a test secondario che ha portato infine all'identificazione di due sostanze che hanno dimostrato una buona biodisponibilità orale e penetrazione nel sistema nervoso centrale nei topi. Questi composti sono del gruppo delle piperidine ariliche, il cui meccanismo d'azione deve essere ancora descritto.

Tratto dall'articolo "*Progress and promise: the current status of spinal muscular atrophy therapeutics*" pubblicato il 12 ottobre 2011 dai dott. James Van Meerbeke e Charlotte Sumner

[leggi](#)