



www.fondodmd.it info@fondodmd.it
Telefono: +39 333 6838999

ASSOCIAZIONE
la Nostra Famiglia

Via Don Luigi Monza, 1 22037 Ponte Lambro (CO)

RELAZIONE TRIENNIO 2009-2012

A tutt'oggi non esiste una terapia risolutiva per la DMD. Sono stati sviluppati una grande varietà di possibili approcci terapeutici che comprendono sia trattamenti farmacologici, che terapie geniche e cellulari. Nel caso della terapia farmacologia, il trattamento più utilizzato è quello con glucocorticoidi, una classe di ormoni steroidei, in grado ridurre la risposta infiammatoria e immunitaria nei pazienti affetti da DMD. Questo come molti altri approcci terapeutici si sono dimostrati, però, palliativi che migliorano la sintomatologia clinica ma non curano la malattia.

Una combinazione di più strategie terapeutiche potrebbe risultare l'approccio vincente nel trattamento di una malattia complessa come la DMD.

Nei tre anni di contratto trascorsi, il mio impegno si è focalizzato nella ricerca di un approccio che combinasse la terapia genica con la terapia cellulare, ingegnerizzando le cellule staminali CD133+ con la tecnica di exon skipping. La tecnica di exon skipping ristabilisce il corretto schema di lettura del gene della distrofina eliminando uno o più esoni corrispondenti alla regione in cui è presente la mutazione.

In particolare, nel 2007 abbiamo pubblicato risultati incoraggianti relativi all'iniezione di cellule staminali CD133+ isolate da pazienti distrofici ingegnerizzate con un vettore virale contenente una cassetta U7-exon51 in grado di mediare lo skipping dell'esone 51 del gene della distrofina umana. Le cellule sono state iniettate in un modello murino di DMD quale il topo scid/mdx (topo distrofico immunodepresso). Nei muscoli dei topi distrofici, non solo è stata dimostrata l'espressione della distrofina umana, ma è stato, altresì, dimostrato come i topi trattati con le cellule ingegnerizzate avessero un significativo miglioramento della forza muscolare.

A fronte di questi risultati incoraggianti, abbiamo pianificato un progetto più ampio finalizzato

alla validazione della combinazione di cellule staminali con la terapia genica, in modelli sperimentali preclinici della DMD, al fine di determinare un possibile trattamento per la patologia. Per questo motivo sono stati selezionati i cani distrofici GRMD, in quanto rappresentano un buon modello animale presentando un decorso della malattia e una massa corporea paragonabile ai bambini DMD. Nel cane GRMD la patologia è determinata da una mutazione puntiforme a livello del sito accettore di splicing dell'introne 6 nel gene della distrofina che porta alla delezione dell'esone 7.

Il mio lavoro ha previsto l'isolamento di cellule staminali CD133+ ottenute da biopsie muscolari di cani GRMD. Le cellule così ottenute sono state infettate con un vettore lentivirale contenente la cassetta U7-exon6-7-8 che consentiva la rimozione degli esoni 6-8 nell'mRNA mutato della distrofina. Il vettore è stato disegnato in collaborazione con il gruppo del dott. Garcia, UFR des sciences de la santé Simone Veil, Université Versailles Saint-Quentin, Montigny-le-Bretonneux, Francia. Questo studio rappresenta un primo tentativo riuscito di utilizzare una cassetta U7 per ingegnerizzare cellule staminali di un modello animale preclinico di DMD; sicuramente la ricaduta più importante dei risultati





www.fondodmd.it info@fondodmd.it
Telefono: +39 333 6838999

ASSOCIAZIONE
la Nostra Famiglia

Via Don Luigi Monza, 1 22037 Ponte Lambro (CO)

ottenuti in questi tre anni è a livello terapeutico; ottimizzare il trapianto autologo nei pazienti DMD significherebbe ridurre al minimo il rischio di rigetto del trapianto di cellule staminali, migliorando ulteriormente la vita del paziente che non si troverebbe più costretto ad assumere farmaci immunosoppressivi per tutta la vita come nel caso di un trapianto eterologo. Parallelamente al progetto condotto sui cani GRMD, abbiamo collaborato con il laboratorio del dott. Levy, Departement de Genetique Medicale, Hopital d'enfants de la Timone, AP-HM, Marseille, Francia, in uno studio che ha visto l'iniezione, in un modello murino di miopatia di Miyoshi (MM), di cellule staminali isolate dal sangue di pazienti affetti da distrofia dei cingoli ed ingegnerizzate con un vettore virale contenente la sequenza della proteina disferlina. Il progetto rappresenta anche in questo caso un'evidenza dell'applicabilità della terapia genica e cellulare combinata in un modello di distrofia muscolare diverso dalla DMD.

Questi tre anni sono stati anche un importante momento di confronto; sono nate, infatti, molte collaborazioni con prestigiosi enti nazionali ed internazionali, tra cui vorrei sicuramente ricordare il Genethon di Evry (Parigi) nella persona del prof. Mavilio, la facility di San Paolo del Brasile che ha consentito il trattamento dei cani GRMD, l'Università di Modena e Reggio Emilia, l'IFOM di Milano e molti altri. Il lavoro di questi tre anni ha, inoltre, prodotto molti importanti risultati che sono stati oggetto di pubblicazioni su prestigiose riviste scientifiche e partecipazioni a congressi nazionali ed internazionali.

I tre anni di contratto appena trascorsi hanno consentito al laboratorio non solo di acquisire nuove tecnologie ma anche collaborazioni e visibilità che ci aiuteranno ad attuare l'ambizioso progetto clinico del prossimo triennio.

PROGETTO TRIENNIO 2014-2017

Al termine del progetto sperimentale sui cani GRMD, l'Associazione La Nostra Famiglia Fondo DMD Gli Amici di Emanuele ha continuato a riporre la sua fiducia in me e nel laboratorio Cellule Staminali garantendomi un ulteriore contratto triennale presso l'Università degli Studi di Milano. Il progetto principale di questo nuovo triennio prevede l'organizzazione e la gestione di un progetto clinico.

Alla luce dei promettenti risultati ottenuti nel modello preclinico e dopo attenti studi di tossicologia e bio-distribuzione, abbiamo pianificato un clinical trial di fase I/II basato sul trapianto autologo di cellule CD133+ isolate da biopsie muscolari di bambini affetti da DMD ingegnerizzate con un vettore lentivirale codificante per AONs in grado di determinare lo skipping dell'esone 51 nel gene della distrofina. Scopo di questo progetto è la produzione in regime GMP/GLP di cellule CD133+ isolate da muscolo distrofico da parte di una Cell Factory riconosciuta e autorizzata dal Ministero della Salute per la produzione di cellule ad uso clinico e di un vettore virale con le medesime caratteristiche prodotto dal Genethon di Parigi. Nell'ultimo anno, abbiamo cominciato a valutare clinicamente la coorte di pazienti che entrerà a fare parte dello studio rispettando i criteri di inclusione ed esclusione molto ben specificati nel progetto e a presentare i documenti al comitato etico





www.fondodmd.it info@fondodmd.it
Telefono: +39 333 6838999

ASSOCIAZIONE
la Nostra Famiglia

Via Don Luigi Monza, 1 22037 Ponte Lambro (CO)

della Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano e all'Istituto Superiore di Sanità.

Nel corso dei prossimi tre anni, abbiamo intenzione di trattare 3-5 bambini DMD di età compresa tra i 9 e i 14 anni con le loro stesse cellule ingegnerizzate a livello del muscolo ADM per determinare la non tossicità e soprattutto l'efficienza del trapianto in termini di espressione della distrofina. I pazienti verranno seguiti per almeno un anno dal trattamento al termine del quale procederemo al trattamento nell'arteria femorale dei pazienti che avranno mostrato i risultati migliori dopo iniezione intramuscolo.

Siamo fiduciosi che al termine di questi tre anni, potremo aiutare a meglio comprendere la fattibilità di un trapianto autologo di cellule staminali ingegnerizzate con metodica di exon skipping nella DMD.

Milano, marzo 2014
Meregalli

Dr.sa Mirella

Fondo DMD gli Amici di Emanuele

