



**UNIVERSITÀ DI MILANO**  
**“CENTRO DINO FERRARI”**

PER LA DIAGNOSI E LA TERAPIA DELLE MALATTIE  
NEUROMUSCOLARI E NEURODEGENERATIVE



**FONDAZIONE I.R.C.C.S. CA' GRANDA**  
**OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO**

FONDAZIONE DI RICOVERO E CURA A CARATTERE  
SCIENTIFICO DI NATURA PUBBLICA

**Progetto di ricerca per il Fondo DMD Gli Amici di Emanuele**

**Distrofia Muscolare di Duchenne: definizione di biomarkers ed interventi terapeutici di correzione epigenetica e patogenetica**

*Istituzioni Coinvolte:*

- Centro Dino Ferrari, Dipartimento di Fisiopatologia Medico-Chirurgica e dei Trapianti (DEPT), Sezione di Neuroscienze, Università degli Studi di Milano, Milano – UOC Neurologia, Fondazione I.R.C.C.S Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano;
- I.R.C.C.S. Istituto Scientifico E. Medea, Bosisio Parini LC

**Finalità**

Sulla base della conoscenza accumulata sulla eziologia e sulla patogenesi della Distrofia Muscolare di Duchenne, un numero molto elevato di linee sperimentali convergono nella sperimentazione clinica di nuovi approcci terapeutici basati sui principi della correzione del meccanismo genetico, della modulazione epigenetica dell'espressione genica muscolare e nella modifica di eventi patogenetici rilevanti.

Le Istituzioni coinvolte, coordinate nel Centro Dino Ferrari, sono parte strategica di una collaborazione finalizzata al raggiungimento degli obiettivi sopra descritti, tramite sperimentazioni cliniche controllate.

Con il presente progetto chiediamo al “Fondo DMD Gli Amici di Emanuele” di istituire una posizione clinico-assistenziale di Dirigente Medico specialista in Neurologia, con particolare qualificazione nella diagnosi e nel follow-up clinico-terapeutico della Distrofia Muscolare di Duchenne, di durata triennale presso l'UOC Neurologia, Fondazione I.R.C.C.S. Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano, con la specifica finalità di garantire continuità e sviluppo alle sperimentazioni in corso e lo sviluppo di nuovi approcci integrati di ricerca innovativa e di clinica per la Distrofia Muscolare di Duchenne.



**UNIVERSITÀ DI MILANO**  
**“CENTRO DINO FERRARI”**

PER LA DIAGNOSI E LA TERAPIA DELLE MALATTIE  
NEUROMUSCOLARI E NEURODEGENERATIVE



**FONDAZIONE I.R.C.C.S. CA' GRANDA**  
**OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO**

FONDAZIONE DI RICOVERO E CURA A CARATTERE  
SCIENTIFICO DI NATURA PUBBLICA

## **Background**

La Distrofia Muscolare di Duchenne (DMD) è una patologia ereditaria grave, progressiva che presenta un impatto molto rilevante dal punto di vista clinico, sociale ed etico.

L'incidenza descritta da Emery negli anni Ottanta era pari ad 1 maschio ogni 3.300; la revisione nel 2012 di questo dato di incidenza risulta in 1 maschio ogni 5.000, riflettendo l'effetto dell'accertamento genetico sulla diminuzione dell'incidenza di malattia.

Al momento attuale non esistono terapie in grado di modificare in modo significativo la storia naturale di questa patologia. La terapia finora disponibile è prevalentemente una terapia di supporto associata ad una precoce introduzione di corticosteroidi che consentono di ritardare solo di pochi anni la perdita della deambulazione, la comparsa di deformità scheletriche e la compromissione della funzionalità cardiaca e respiratoria (Bushby K, et al., 2004, Biggar WD et al., 2006). Negli ultimi anni tuttavia i notevoli progressi raggiunti nella caratterizzazione clinica e genetica di questa forma di distrofia hanno posto le basi per una migliore comprensione della sua patogenesi. Questo è stato un passo fondamentale in quanto una conoscenza dettagliata dei processi patogenetici ha consentito di identificare possibili target terapeutici e di selezionare nuove molecole che potenzialmente potrebbero modificare la storia naturale della malattia. L'efficacia di alcune di queste molecole è attualmente testata in sperimentazioni cliniche. La miglior comprensione della patogenesi ha inoltre consentito di definire biomarcatori, passo fondamentale in quanto questi potranno essere utilizzati sia nel follow-up della patologia sia per monitorare l'efficacia delle terapie sperimentali.

## Aspetti patogenetici nella Distrofia Muscolare di Duchenne

La distrofina, proteina assente nella DMD, è una proteina strutturale del sarcolemma. La sofferenza muscolare che caratterizza il quadro clinico della DMD è determinata non solo dalla maggiore fragilità della fibra muscolare conseguente all'assenza di tale proteina ma anche da una cascata di eventi determinati dalla instabilità della membrana quali l'ingresso incontrollato di calcio e fenomeni di apoptosi, necrosi, infiammazione e sostituzione fibrotica (Fairclough RJ et al, 2012). I principali approcci terapeutici testati fino ad oggi sono prevalentemente di tre tipi: un primo gruppo di farmaci agisce a livello genetico ed ha come obiettivo quello di ripristinare la completa espressione della distrofina (Ataluren, oligonucleotidi antisense), un secondo gruppo promuove meccanismi di compenso (quali la over-espressione di utrofina), il terzo interviene sulla cascata di



**UNIVERSITÀ DI MILANO**  
**“CENTRO DINO FERRARI”**

PER LA DIAGNOSI E LA TERAPIA DELLE MALATTIE  
NEUROMUSCOLARI E NEURODEGENERATIVE



**FONDAZIONE I.R.C.C.S. CA' GRANDA**  
**OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO**

FONDAZIONE DI RICOVERO E CURA A CARATTERE  
SCIENTIFICO DI NATURA PUBBLICA

eventi intracellulari provocati dalla assenza di distrofina. A questo gruppo di farmaci appartengono molecole in grado di ridurre il rilascio di calcio e la fibrosi, così come farmaci con effetto antiinfiammatorio o in grado di ripristinare nel muscolo una normale quantità di ossido nitrico (Fairclough RJ et al, 2012). Sono state inoltre identificate molecole in grado di agire a livello epigenetico, queste esercitano il proprio effetto regolando la trascrizione di più geni e possono agire pertanto su più fronti.

Il muscolo DMD è un tessuto altamente destrutturato, caratterizzato da elevata necrosi, fibrosi e dalla presenza di infiltrati infiammatori. L'elevato influsso di calcio determinato dalla fragilità della membrana determina un aumento dello stress ossidativo e una risposta immune cronica che a loro volta peggiorano la degenerazione muscolare (Lapidos KA et al., 2004). E' stato dimostrato che la risposta infiammatoria è mediata dal fattore di trascrizione NF-kB, un fattore di trascrizione pleiotropico che è rilasciato dalle cellule in seguito a stress acuti (Kumar A. et al., 2003). Gli steroidi, farmaci già abitualmente utilizzati nella DMD, agiscono parzialmente su questa via (De Bosscher K et al., 1997), ma altre molecole più specifiche, quali il flavocoxid, la curcuma o gli inibitori diretti di NF-kB sono attualmente in fase di studio (Pan Y et al., 2008; Messina S et al., 2009). Altri farmaci, quali ad esempio i donatori di ossido nitrico o gli inibitori della fostodiesterasi, agiscono su una via differente. La perdita della distrofina e del complesso legato alla distrofina determina nei pazienti, così come nei modelli murini, una delocalizzazione della ossido nitrico sintetasi neuronale (nNOS) e una conseguente riduzione dell'ossido nitrico (NO) (Brenman et al., 1995). L'NO ha un effetto protettivo per il muscolo in quanto agisce come scavenger per i radicali liberi, promuove la vasodilatazione e ha una azione sulla contrazione muscolare tramite la produzione di GMP ciclico (Lau KS et al. 1998). La sua riduzione nella Distrofia Muscolare di Duchenne può contribuire alla sofferenza muscolare. Sono stati finora studiati in trial clinici sia i donatori di ossido nitrico (Mizunoya W et al., 2011) sia gli inibitori della fosfodiesterasi (Sander M et al., 2000).

Altre vie che potrebbero essere potenzialmente oggetto di studio, ma che non sono ancora state approfondite in trial clinici, sono quelle che promuovono la riduzione dell'ingresso di calcio (Gehrig SM et al., 2012), della degradazione proteica e dei processi di fibrosi. L'aumentata degradazione proteica, tipica della DMD, avviene attraverso il sistema ubiquitina-proteasoma, e può essere ridotta attraverso l'utilizzo di inibitori delle proteasi e del proteasoma (Lescop C et al., 2005). Gli inibitori del TGF- $\beta$  possono invece favorire la rigenerazione muscolare, dal momento che la sua



**UNIVERSITÀ DI MILANO**  
**“CENTRO DINO FERRARI”**

PER LA DIAGNOSI E LA TERAPIA DELLE MALATTIE  
NEUROMUSCOLARI E NEURODEGENERATIVE



**FONDAZIONE I.R.C.C.S. CA' GRANDA**  
**OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO**

FONDAZIONE DI RICOVERO E CURA A CARATTERE  
SCIENTIFICO DI NATURA PUBBLICA

produzione da parte delle cellule infiammatorie è uno dei principali mediatori della fibrosi (Taniguti AP et al., 2011).

### **Risultati preliminari**

Il gruppo di ricerca afferente al Laboratorio di Biochimica e Genetica dell'Ospedale Maggiore Policlinico, in collaborazione con la U.O. Neuromuscolare IRCCS E. Medea Bosisio Parini è da anni punto di riferimento anche per realtà esterne al Policlinico di Milano per la diagnosi, il follow-up e la terapia di pazienti affetti da patologie neuromuscolari ed in particolare per pazienti affetti da DMD.

La costituzione di un gruppo di ricerca eterogeneo e specializzato nello studio delle patologie neuromuscolari composto da neurologi, biologi molecolari, radiologi, fisioterapisti, cardiologi e pneumologi ha consentito l'inserimento del nostro gruppo nel panorama della ricerca per la DMD sia a livello nazionale sia a livello internazionale ed ha portato a risultati rilevanti in più ambiti di ricerca di base e ricerca clinica applicata. Questi risultati sono stati presentati a congressi e sono stati oggetto di pubblicazione su riviste internazionali.

### **1. Caratterizzazione molecolare della DMD**

Una corretta caratterizzazione molecolare è un presupposto fondamentale per ogni progetto di ricerca nell'ambito delle distrofie muscolari. Raggiungere una corretta definizione genetica è fondamentale ai fini diagnostici ma è diventato ancor più importante negli ultimi anni in quanto tutti i trial terapeutici si basano su una corretta definizione molecolare e molti di essi sono applicabili solo a determinate sotto-categorie di pazienti definite sulla base del tipo di mutazione.

Presso il nostro laboratorio viene correntemente effettuata la diagnosi molecolare di DMD non solo per i pazienti afferenti al nostro Istituto, ma anche per pazienti provenienti da altri centri Italiani. Negli ultimi anni abbiamo affiancato alle tecniche tradizionali che consentivano la ricerca di delezioni e duplicazioni anche il completo sequenziamento del gene DMD. Lo studio molecolare, effettuato anche in modo retrospettivo, ha consentito di caratterizzare più di 300 soggetti affetti da DMD, portando anche ad una definizione di dettagliate correlazioni genotipo-fenotipo (Magri et al., J Neurol 2011). E' stato ad esempio possibile dimostrare che il tipo di mutazione non influenza l'andamento clinico per quanto riguarda l'interessamento muscolare, cardiaco e respiratorio. Tale implemento nella diagnostica ci ha consentito di raggiungere una diagnosi molecolare nella quasi



**UNIVERSITÀ DI MILANO**  
**“CENTRO DINO FERRARI”**

PER LA DIAGNOSI E LA TERAPIA DELLE MALATTIE  
NEUROMUSCOLARI E NEURODEGENERATIVE



**FONDAZIONE I.R.C.C.S. CA' GRANDA**  
**OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO**

FONDAZIONE DI RICOVERO E CURA A CARATTERE  
SCIENTIFICO DI NATURA PUBBLICA

totalità dei pazienti con sospetto clinico di DMD (99% nella nostra casistica, Magri F et al., J Neurol 2011). Ci ha inoltre permesso di identificare in alcuni casi riarrangiamenti complessi, non individuabili con metodiche tradizionali (Magri F et al., BMC Med Genet 2011), e di creare un database aggiornato che è stato utilizzato per la selezione di pazienti da arruolare in trial clinici.

## 2. Caratterizzazione clinica e definizione di storia naturale

Il nostro lavoro di ricerca ha consentito la creazione di un database clinico-molecolare che contiene più di 300 pazienti affetti da DMD seguiti presso il nostro Istituto e presso l'UO Neuromuscolare di Bosisio Parini.

Questa coorte di pazienti rappresenta una delle più numerose coorti descritte in Italia.

Il database contiene dettagliati dati bioptici, molecolari e dati relativi alla compromissione neuromuscolare, cardiaca e respiratoria. Sono state definite in modo accurato alcuni aspetti fondamentali di storia naturale quali l'età di diagnosi, di perdita della deambulazione, di comparsa della compromissione cardiaca e respiratoria. Il follow-up per la maggior parte dei pazienti è superiore a 10 anni.

I dettagliati dati clinici, molecolari e bioptici hanno consentito di delineare alcuni aspetti fondamentali nella storia naturale di questa patologia (Magri F. et al, 2011), così come alcune correlazioni genotipo fenotipo.

Una conoscenza dettagliata di alcuni parametri, quali l'età di perdita di deambulazione autonoma, la tipologia e la modalità di insorgenza di interessamento cardiaco e respiratorio si è rivelata inoltre fondamentale ai fini di valutare l'efficacia di alcune terapie e di definire i criteri di inclusione dei pazienti nei differenti trial terapeutici.

La disponibilità di un elevato numero di biopsie muscolari e dei dati clinici inerenti a ciascun campione ha inoltre consentito di delineare le principali modificazioni del quadro bioptico nel corso dei primi anni di malattia. Questo lavoro è particolarmente rilevante anche in considerazione delle possibili conseguenze dal punto di vista terapeutico. Nel corso degli anni infatti è stato suggerito come l'osservazione diretta del muscolo sia essenziale per dimostrare se effettivamente i miglioramenti evidenziati dalle valutazioni funzionali durante trial clinici siano correlate a modificazioni nel tessuto muscolare. La maggior parte delle sperimentazioni proposte negli ultimi anni ha considerato la biopsia muscolare tra le misure di outcome. Addirittura uno di esse, il trial con



**UNIVERSITÀ DI MILANO**  
**“CENTRO DINO FERRARI”**

PER LA DIAGNOSI E LA TERAPIA DELLE MALATTIE  
NEUROMUSCOLARI E NEURODEGENERATIVE



**FONDAZIONE I.R.C.C.S. CA' GRANDA**  
**OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO**

FONDAZIONE DI RICOVERO E CURA A CARATTERE  
SCIENTIFICO DI NATURA PUBBLICA

farmaco Givnostat, ha posto la biopsia muscolare come outcome primario. Tuttavia un'analisi sistematica e longitudinale delle variazioni del quadro bioptico nel tempo è assente in letteratura. In collaborazione con la UO Neuromuscolare del nostro Ospedale è stato effettuato pertanto un studio retrospettivo sulle biopsie muscolari a nostra disposizione al fine di fornire uno strumento riproducibile per la valutazione e il confronto in gruppi di pazienti affetti da DMD. In questo lavoro le biopsie muscolari sono state valutate sulla base di differenti parametri quali l'entità della sostituzione connettivale, il numero di fibre in necrosi, l'entità della rigenerazione fibrile. Abbiamo analizzato 56 biopsie di pazienti DMD, 40 privi di trattamenti farmacologici e 16 in terapia steroidea, e le abbiamo confrontate con 20 biopsie controllo. I dati raccolti nei pazienti privi di terapia steroidea hanno consentito di costruire una storia naturale istologica di questa patologia e di dimostrare come un aumento del tessuto connettivale sia già presente nel primo anno di vita, rimanga stabile fino al sesto anno di età e presenti un aumento costante e progressivo a partire dai 6-7 anni. Anche il numero di fibre in rigenerazione aumenta fino ai 6 anni per poi stabilizzarsi, mentre la percentuale di fibre necrotiche non si modifica nel tempo ma è maggiore nei pazienti non trattati con steroide. Lo studio ha pertanto permesso di definire come l'età compresa tra i 6 e i 7 anni rappresenti un momento cruciale nel corso dell'evoluzione della patologia, ossia la perdita della capacità di rigenerazione del muscolo. Questo dato è fondamentale per guidare l'età di inizio di eventuali terapie sperimentali, che andrebbero intraprese prima che il muscolo perda la capacità di rigenerarsi e quindi idealmente prima dei 6 anni di età.

### 3. Definizione di misure di outcome

Il nostro gruppo di ricerca ha partecipato a numerosi progetti collaborativi con altri centri neuromuscolari Italiani volti alla definizione di misure di outcome clinico. La possibilità di provare la reale efficacia di potenziali approcci terapeutici infatti si basa sulla possibilità di dimostrare l'effettiva modificazione della storia naturale della patologia. A questo fine negli ultimi anni è diventato sempre più importante definire quali siano le misure di outcome che possano meglio dimostrare questo cambiamento. Al momento attuale per la DMD sono state utilizzati differenti strumenti di misura. Tra di questi le scale maggiormente utilizzate sono il six-minute-walking.test, la scala North Star, così come la Upper Limb scale (PUL), disegnata in modo specifico per valutare la forza degli arti superiori, ma la loro sensibilità e specificità non sono ancora state completamente dimostrate. I dati di follow-up raccolti presso i nostri centri sono stati fondamentali



**UNIVERSITÀ DI MILANO**  
**“CENTRO DINO FERRARI”**

PER LA DIAGNOSI E LA TERAPIA DELLE MALATTIE  
NEUROMUSCOLARI E NEURODEGENERATIVE



**FONDAZIONE I.R.C.C.S. CA' GRANDA**  
**OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO**

FONDAZIONE DI RICOVERO E CURA A CARATTERE  
SCIENTIFICO DI NATURA PUBBLICA

per poter partecipare a progetti collaborativi che hanno valutato l'efficacia di queste scale nel tracciare la progressione della compromissione muscolare nel tempo e sono stati oggetto di pubblicazioni scientifiche (Mazzone et al 2009; Mazzone et al. 2012; Pane et al., 2013). Il follow-up di questi pazienti è tuttora in corso nell'ambito di un progetto collaborativo che sulla scorta dei risultati interessanti finora ottenuti ha come obiettivo la prosecuzione dell'osservazione di questi pazienti nel tempo al fine di arricchire le nostre conoscenze sull'evoluzione clinica di questa patologia.

#### **4. Nuove prospettive terapeutiche**

Negli ultimi anni i progressi nella caratterizzazione clinica e genetica della DMD hanno posto le basi per lo sviluppo di numerose sperimentazioni terapeutiche. Numerosi nuovi approcci, dai trattamenti farmacologici alla terapia genica e cellulare, sono stati testati sia in vitro sia in vivo, ma solo la traslazione nell'uomo consente di dimostrarne la reale efficacia. Alcuni aspetti fondamentali, quali la sicurezza e i comprovati effetti benefici nei pazienti, devono essere confermati prima che questi approcci possano essere utilizzati su ampia scala per la cura delle patologie muscolari.

La disponibilità di un database clinico genetico dettagliato e di valutazioni/rivalutazioni cliniche conformi a criteri definiti dalle linee guida internazionali sono aspetti indispensabili per garantire ai pazienti le cure ottimali e l'accesso a trial clinici.

La competenza nella caratterizzazione clinica e molecolare ha consentito alla nostra UO di essere inserita in numerose sperimentazioni terapeutiche su scala nazionale ed internazionale.

Dal 2008 ad oggi la UO di Neurologia ha partecipato a 8 differenti trial clinici internazionali ed 1 trial clinico nazionale in pazienti affetti da Distrofia Muscolare di Duchenne. Altri tre trial clinici sono stati inoltre effettuati presso l'UO neuromuscolare IRCCS E.Medea Bosisio Parini.

La partecipazione a tali sperimentazioni ha richiesto la valutazione ambulatoriale di più di 60 pazienti affetti da DMD, al fine di valutare i criteri di inclusione e di esclusione e di selezionare i pazienti più adatti a ciascun tipo di approccio terapeutico. Sono stati arruolati 24 pazienti che sono stati valutati presso la nostra UO con valutazioni settimanali in alcuni casi e mensili/trimestrali nella maggior parte dei casi, per un totale di più di 100 visite all'anno.

La maggior parte di questi trial è attualmente ancora in corso. I risultati preliminari della maggior parte di essi sono tuttavia incoraggianti e sono stati oggetto di presentazioni a congressi e in alcuni casi di pubblicazioni scientifiche (Bushby K. et al., 2014; Buyse GM et al., 2015).



**UNIVERSITÀ DI MILANO**  
**“CENTRO DINO FERRARI”**

PER LA DIAGNOSI E LA TERAPIA DELLE MALATTIE  
NEUROMUSCOLARI E NEURODEGENERATIVE



**FONDAZIONE I.R.C.C.S. CA' GRANDA**  
**OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO**

FONDAZIONE DI RICOVERO E CURA A CARATTERE  
SCIENTIFICO DI NATURA PUBBLICA

I farmaci testati sono molecole che agiscono con due principali differenti meccanismi d'azione: modificazioni a livello molecolare che consentano il ripristino della sintesi di distrofina o stimolazione di meccanismi di compenso che incrementino la miogenesi e riducano la necrosi muscolare.

#### **4.1 Correzione del meccanismo genetico: Ataluren ed oligonucleotidi antisenso**

Tra i farmaci in grado di agire a livello molecolare sono stati studiati molecole in grado di promuovere il reading through di stop codon patologici (Ataluren) o lo skipping di alcuni esoni della distrofina al fine di ripristinare il frame di lettura (oligonucleotidi antisenso).

Ataluren è stato uno dei primi farmaci testato nella popolazione DMD in studi clinici di fase IIb (Bushby K. et al., 2014); la valutazione della sua efficacia è attualmente in corso in uno studio di fase III. La nostra UO ha partecipato ad entrambi gli studi. Attualmente seguiamo 12 pazienti trattati con questo farmaco, 7 arruolati nello studio IIb e 5 inclusi nello studio di fase III. I promettenti dati relativi allo studio di fase IIb sono stati recentemente pubblicati (Bushby K. et al., 2014) e sono stati fondamentali al fine di consentire l'approvazione dell'utilizzo di questo farmaco anche in Italia. L'Agenzia Italiana del Farmaco ha infatti recentemente fornito parere favorevole alla richiesta dell'inserimento di Ataluren nell'elenco dei farmaci erogabili a totale carico del Servizio Sanitario Nazionale. Il suo utilizzo è limitato a uno specifico sottogruppo di pazienti DMD, portatori di mutazioni nonsense ma questo passo è fondamentale in quanto è la prima dimostrazione della reale possibilità di traslare risultati preclinici nella pratica clinica nella Distrofia Muscolare di Duchenne.

Una seconda tipologia di farmaci in grado di agire a livello molecolare al fine di promuovere il ripristino della distrofina e sperimentati nella DMD sono gli oligonucleotidi antisenso. Queste molecole sono in grado di promuovere lo skipping di un esone del gene della distrofina, ripristinando il frame di lettura e consentendo la produzione di una molecola più corta ma funzionale che dovrebbe rendere il quadro clinico più simile a quello della Distrofia Muscolare di Becker (BMD) (van Deutekom JCT et al., 2001). Nella DMD fino ad ora sono stati utilizzati due differenti oligonucleotidi antisenso: i farmaci Drisapersen ed Eterlipsen. Entrambe le molecole si sono dimostrate efficaci in studi preclinici (Aartsma-Ruts et al., 2003; Lu et al., 2003) e in studi preliminari su piccoli gruppi di pazienti (Mendell J. et al, 2013; Voit T et al., 2014). La nostra UO ha partecipato allo studio clinico di fase III DMD114044 e alla sua fase di estensione. In questo studio



**UNIVERSITÀ DI MILANO**  
**“CENTRO DINO FERRARI”**

PER LA DIAGNOSI E LA TERAPIA DELLE MALATTIE  
NEUROMUSCOLARI E NEURODEGENERATIVE



**FONDAZIONE I.R.C.C.S. CA' GRANDA**  
**OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO**

FONDAZIONE DI RICOVERO E CURA A CARATTERE  
SCIENTIFICO DI NATURA PUBBLICA

il farmaco Drisapersen è stato somministrato settimanalmente sottocute in soggetti DMD deambulanti. Nella nostra UO abbiamo seguito 3 pazienti DMD per più di tre anni programmando somministrazioni settimanali e frequenti valutazioni cliniche al fine di monitorare strettamente effetti collaterali ed efficacia.. Il farmaco nei pazienti da noi trattati è stato ben tollerato, con comparsa solo di alterazioni cutanee. Lo studio è stato interrotto nel 2014 per il mancato raggiungimento di significatività statistica. Tuttavia i risultati sono stati presentati a numerosi congressi internazionali e la ditta farmaceutica Prosensa, recentemente acquisita da Biomarin, sta continuando a valutare l'efficacia del farmaco (Voit T et al., 2014).

#### **4.2 Correzione di eventi patogenetici: ruolo dell'Ossido Nitrico**

La riduzione del rilascio di ossido nitrico è un evento patogenetico fondamentale nella DMD (Brennan et al., 1995). Alla sua riduzione si è provato ad ovviare con due principali strategie terapeutiche: promuovendo il suo rilascio attraverso l'utilizzo di farmaci donatori di NO o prolungando la durata della sua azione.

L'associazione di Ibuprofene, un antiinfiammatorio non steroideo, e isosorbide dinitrato, donatore di ossido nitrico, è stata testata presso l'UO Neuromuscolare IRCCS E Medea in un gruppo eterogeneo di pazienti distrofici in uno studio pilota in aperto (D'Angelo MG et al., 2012). Nello studio sono stati arruolati 71 pazienti, 35 trattati e 36 controlli. Il gruppo comprendeva pazienti affetti da Distrofia Muscolare dei Cingoli, Distrofia Muscolare di Duchenne e Distrofia Muscolare di Becker. I pazienti sono stati trattati per un periodo di 12 mesi. La terapia è stata ben tollerata ed ha determinato effetti collaterali lievi e transitori quali ad esempio cefalea ed ipotensione. L'analisi delle misure di efficacia ha dimostrato un trend in miglioramento che tuttavia ha presentato una significatività statistica solo in una dimensione della scala Motor Function Measure (MFM). La combinazione dei due farmaci dovrà essere testata su un gruppo più ampio di pazienti affinché possa esserne confermata l'efficacia.

Il secondo farmaco in corso di sperimentazione, Tadalafil, effettua la sua azione terapeutica in quanto inibitore della fosfodiesterasi. Come già sottolineato la riduzione di ossido nitrico nella DMD è responsabile di sofferenza muscolare. In precedenti lavori è stato dimostrato che questo farmaco è in grado di ridurre l'ischemia muscolare in soggetti BMD (Martin EA et al., 2012), ed il suo utilizzo in un gruppo di 10 bambini DMD trattati in aperto, ha ridotto l'ischemia e aumentato il flusso sanguigno durante esercizio (Nelson MD et al., 2014). Tadalafil è attualmente testato in uno studio



**UNIVERSITÀ DI MILANO**  
**“CENTRO DINO FERRARI”**

PER LA DIAGNOSI E LA TERAPIA DELLE MALATTIE  
NEUROMUSCOLARI E NEURODEGENERATIVE



**FONDAZIONE I.R.C.C.S. CA' GRANDA**  
**OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO**

FONDAZIONE DI RICOVERO E CURA A CARATTERE  
SCIENTIFICO DI NATURA PUBBLICA

di fase III in doppio cieco. Lo studio ha previsto l'inclusione di 306 pazienti, trattati con il farmaco ad alte dosi, a basse dosi o con placebo. La maggior parte dei pazienti ha terminato la prima fase dello studio, della durata di un anno, ed è entrata nella fase di estensione. Presso la nostra UO sono stati arruolati due pazienti, seguiti ormai da un anno. Al momento attuale non sono stati evidenziati particolari effetti collaterali, ma l'analisi delle misure di efficacia è ancora in corso.

#### **4.3 Riduzione radicali liberi: Idebenone**

Nel muscolo distrofico i diffusi processi di infiammazione, fibrosi ed alterazione dell'omeostasi del calcio si accompagnano a aumentata produzione di radicali liberi che determina stress ossidativo. E' stato dimostrato che farmaci quali il Coenzima Q10 sono in grado di ridurre questo processo (Okamoto T et al., 1995). In particolare Idebenone, un suo derivato sintetico, è in grado di penetrare più facilmente nelle cellule ed è stato utilizzato come potenziale terapia nella DMD. Il farmaco è stato sperimentato in uno studio multicentrico di fase III al quale ha partecipato l'UO Neuromuscolare IRCCS E Medea Bosisio Parini. Il trial in doppio cieco è stato condotto in condotto in 64 DMD (31 trattati e 33 controlli) ed ha dimostrato un miglioramento della funzionalità respiratoria (Buyse GM et al., 2015) con minimi effetti collaterali.

#### **4.3 Modulazione epigenetica**

Una ulteriore possibilità terapeutica per la popolazione DMD è l'utilizzo di farmaci che siano in grado di promuovere una modulazione a livello epigenetico. Un esempio di farmaco con tale meccanismo d'azione è Givinostat. Il farmaco Givinostat è un inibitore dell'istone deacetilasi attualmente utilizzato anche in pazienti affetti da Policitemia vera. Questo farmaco è in grado di agire a livello epigenetico, ripristinando la trascrizione dei geni altrimenti soppressi. La scarsa produzione di NO nella DMD determina infatti una inefficiente nitrosilazione di questa istone deacetilasi che rimane pertanto attiva in modo costitutivo con conseguente inibizione dei suoi geni bersaglio, che in questo caso verrebbe ripristinata (Consalvi S et al., 2013). In questo modo Givinostat è in grado di inibire i processi che sono alla base della sostituzione fibrotica del muscolo e stimola la rigenerazione muscolare. Studi in modelli murini hanno dimostrato che questo farmaco è in grado di rallentare la progressione della malattia (Consalvi Set al., 2013) e che dal punto di vista istologico la sua somministrazione per tempo prolungato determina un aumento della



**UNIVERSITÀ DI MILANO**  
**“CENTRO DINO FERRARI”**

PER LA DIAGNOSI E LA TERAPIA DELLE MALATTIE  
NEUROMUSCOLARI E NEURODEGENERATIVE



**FONDAZIONE I.R.C.C.S. CA' GRANDA**  
**OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO**

FONDAZIONE DI RICOVERO E CURA A CARATTERE  
SCIENTIFICO DI NATURA PUBBLICA

dimensione delle fibre e una riduzione degli infiltrati infiammatori e della formazione di tessuto cicatriziale (Consalvi S et al.,2013).

Questo farmaco è stato studiato in un trial di fase II condotto in 20 pazienti arruolati in 5 differenti centri italiani, 5 dei quali seguiti presso la nostra UO. Sono stati reclutati pazienti DMD di età compresa tra i 7 e gli 11 anni. L'obiettivo primario dello studio è stata la valutazione di modificazioni istologiche e pertanto una biopsia muscolare è stata effettuata al momento dell'arruolamento e dopo 12 mesi di trattamento. Obiettivi secondari sono stati la sicurezza e il miglioramento clinico valutato tramite apposite scale. Il reclutamento dei pazienti è stato impegnativo, per la comparsa di effetti collaterali legati al dosaggio, in particolare piastrinopenia. I pazienti sono in terapia con il farmaco sperimentale da 2 anni.

L'analisi dei dati bioptici a distanza di un anno di trattamento ha dimostrato un aumento del tessuto muscolare e una riduzione del numero di necrosi e della quantità di tessuto fibrotico. In particolare l'area delle fibre muscolari è aumentata del 29% e la fibrosi perimisiale ed endomisiale è diminuita del 27%. La necrosi si è ridotta in tutti i soggetti ad eccezione di uno così come la sostituzione connettivale. Non sono state riscontrate differenze legate al tipo di mutazione. Il farmaco è stato ben tollerato. I risultati dello studio sono attualmente in fase di pubblicazione. Questo farmaco è il primo che ha dimostrato in modo concreto una reale modificazione del quadro istopatologico. Tale obiettivo è fondamentale anche considerando che la storia naturale della malattia, come evidenziato anche dai nostri studi, prevede un peggioramento progressivo dopo i 6 anni di età. E' in programma la definizione di uno studio che coinvolga un maggior numero di pazienti e che sia volto a misurare con precisione non solo i miglioramenti istologici, come lo studio attualmente in corso, ma anche le modificazioni di storia naturale, in modo da poter confermare questi dati su un numero maggiore di pazienti.

## **Prospettive di sviluppo futuro**

### 1. Misure di outcome nella DMD: utilità della Risonanza Magnetica muscolare

Negli ultimi anni l'incremento di trial terapeutici nelle patologie neuromuscolari ha reso sempre più necessaria la definizione di parametri di valutazione della loro efficacia. In quest'ambito ci



**UNIVERSITÀ DI MILANO**  
**“CENTRO DINO FERRARI”**

PER LA DIAGNOSI E LA TERAPIA DELLE MALATTIE  
NEUROMUSCOLARI E NEURODEGENERATIVE



**FONDAZIONE I.R.C.C.S. CA' GRANDA**  
**OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO**

FONDAZIONE DI RICOVERO E CURA A CARATTERE  
SCIENTIFICO DI NATURA PUBBLICA

proponiamo di approfondire l'utilità della Risonanza Magnetica (RM) muscolare quale metodo non invasivo, riproducibile e ripetibile nel tempo per valutare il grado di sostituzione connettivale, di necrosi e di infiammazione muscolare in pazienti affetti da DMD. Questa metodica negli ultimi anni è stata applicata anche nel nostro istituto nello studio di numerose patologie muscolari, ai fini di guidare la diagnosi differenziale e la definizione della storia naturale. E' stata inoltre utilizzata nell'ambito del trial clinico con farmaco Givinostat in un gruppo limitato di 20 pazienti Italiani per valutare le modificazioni occorse a livello muscolare a distanza di un anno dall'inizio del trattamento. A tal fine è stata confrontata con i risultati ottenuti dalla biopsia muscolare. Al momento attuale tuttavia esistono pochi dati che consentano di ricostruire le modificazioni nel tempo del quadro di risonanza muscolare nella popolazione DMD (Senesac CR et al., 2015) ed in particolare mancano studi di valutazione della muscolatura degli arti superiori. La raccolta di dati che permettano di tracciare tali modificazioni nel tempo in una popolazione DMD non inclusa in trial terapeutici sarebbe fondamentale al fine di definire l'efficacia di eventuali terapie sperimentali. Ci proponiamo pertanto di studiare con tale metodica pazienti affetti da DMD a diversi stadi di malattia, programmando possibilmente un follow-up nel tempo, in modo da ricavare dati che consentano di definire il pattern di interessamento muscolare, valutare la progressione di malattia e predire l'evoluzione nel tempo. Si potranno inoltre confrontare i parametri di sostituzione connettivale ed infiammazione ricavati tramite neuroimaging con quelli ottenuti tramite biopsia muscolare.

2. Studio della storia naturale di malattia e definizione di nuovi parametri strumentali nella diagnosi e nel follow-up

Verrà proseguita la ricerca di end-point clinici per trial terapeutici.

Approfittando dell'ampia coorte di pazienti a disposizione raccoglieremo dati sull'applicazione delle misure di outcome che rappresentano l'attuale "gold standard" e sulla definizione di potenziali nuove misure di valutazione.

In particolare verrà proseguita la raccolta dei dati funzionali nei pazienti seguiti presso il nostro Istituto e presso IRCCS E Medea al fine di valutare quale siano le misure migliori per definire la storia naturale della malattia. Verranno inoltre valutate differenti scale funzionali al fine di definire quali siano più sensibili per tracciare eventuali modificazioni durante il trattamento con farmaci sperimentali.



**UNIVERSITÀ DI MILANO**  
**“CENTRO DINO FERRARI”**

PER LA DIAGNOSI E LA TERAPIA DELLE MALATTIE  
NEUROMUSCOLARI E NEURODEGENERATIVE



**FONDAZIONE I.R.C.C.S. CA' GRANDA**  
**OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO**

FONDAZIONE DI RICOVERO E CURA A CARATTERE  
SCIENTIFICO DI NATURA PUBBLICA

3. Identificazione di biomarkers quali modulatori genici o polimorfismi correlati alla gravità della malattia o alla risposta farmacologica

Nonostante la storia naturale della DMD sia generalmente abbastanza riproducibile, alcuni casi presentano una variabilità nella severità e nella progressione, che seppur lieve dal punto di vista statistico è tuttavia estremamente rilevante per il singolo individuo. L'identificazione di modificatori genetici potrebbe offrire una prognosi più accurata, e informazioni farmacogenetiche utili nella prescrizione di terapie o nel disegno di trial clinici. E' stato ad esempio dimostrato il ruolo dell'osteopontina come modificatore genetico nella DMD (Bello L. et al., 2013), suggerendo, in linea di principio, la potenziale rilevanza dei modificatori genetici nella progressione delle distrofie muscolari. Anche polimorfismi in LTBP4, agiscono come fattore protettivo mitigando la storia naturale della malattia (Bello L. et al., 2015).

In collaborazione con il Dipartimento di Neuroscienze dell'Università di Padova verrà proseguito lo studio di potenziali marcatori genetici al fine di valutare l'effettivo contributo di questi polimorfismi e la presenza di eventuali ulteriori fattori in grado di portare a modificazioni del decorso clinico.

Nel nostro laboratorio utilizzeremo la metodica di “RNA seq expression profiling” utilizzata al fine di identificare modificatori genetici, set di geni sregolati che verranno analizzati mediante “single nucleotide polymorphisms (SNPs) discovery”.

Verranno inoltre effettuati studi di proteomica al fine di evidenziare eventuali modificazioni del livello di altre proteine e la modificazione di alcuni meccanismi post-traduzionali, quali la fosforilazione proteica.

Sebbene il fattore patogenetico primario nella DMD sia il deterioramento dei complessi glicoproteici associati alla distrofina, altre alterazioni secondarie possono rappresentare eventi critici, come dimostrato dalla alterata espressione nelle fibre deficitarie di distrofina di un largo numero di proteine con un'ampia varietà di funzioni cellulari, quali proteine leganti il Ca<sup>2+</sup> nei microsomi distrofici, la “luminal Ca<sup>2+</sup>-binding element” calsequestrina, l'enzima metabolico adenilato chinasi e la proteina muscolo specifica cvHsp. Lo studio di queste proteine potrebbe essere utile per meglio comprendere la patogenesi e fornire importanti spunti per lo sviluppo di nuovi potenziali approcci terapeutici.

4. Ricerca di nuovi approcci terapeutici e partecipazione a trial clinici internazionali



**UNIVERSITÀ DI MILANO**  
**“CENTRO DINO FERRARI”**

PER LA DIAGNOSI E LA TERAPIA DELLE MALATTIE  
NEUROMUSCOLARI E NEURODEGENERATIVE



**FONDAZIONE I.R.C.C.S. CA' GRANDA**  
**OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO**

FONDAZIONE DI RICOVERO E CURA A CARATTERE  
SCIENTIFICO DI NATURA PUBBLICA

La nostra UO rinnoverà il proprio impegno nella partecipazione a trial clinici di rilevanza nazionale ed internazionale. Verranno proseguiti gli studi attualmente in corso. Il continuo aggiornamento del database di pazienti consentirà di avere una fonte sempre aggiornata per la selezione dei possibili candidati a trial terapeutici. La definizione dettagliata delle caratteristiche cliniche e molecolari consentirà di offrire ai pazienti la sperimentazione più adatta, scelta nell'ambito di un'ampia possibilità di opzioni terapeutiche

Si testeranno sia nuovi approcci farmacologici, sia farmaci già verificati in patologie differenti applicando il nuovo concetto di “riposizionamento del farmaco”, intendendo l'utilizzo di farmaci già noti per malattie precedentemente non trattate.

**Elenco Trial clinici a cui la nostra UO ha partecipato**

1. Giugno 2008 - giugno 2009 trial terapeutico internazionale multicentrico di fase 2b PTC124-GD-007-DMD. studio multi-centrico, randomizzato, in doppio cieco placebo e controllo sull'efficacia del farmaco Ataluren nella Distrofia Muscolare di Duchenne.
2. Luglio 2009-aprile 2010 trial terapeutico internazionale multicentrico PTC124-GD-007e-DMD, “Studio di estensione di fase 2b sull'uso di PTC124 in soggetti affetti da distrofia muscolare di Duchenne e Becker mediata da mutazione non senso”.
3. Gennaio 2011 - dicembre 2013 trial clinico GSK 114044, studio di fase III, randomizzato in doppio cieco verso placebo, per valutare l'efficacia e la sicurezza del farmaco GSK2402968 promuovente l'exon skipping dell'esone 51 del gene DMD. “A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study to assess the efficacy and safety of GSK2402968 in ambulant subjects with Duchenne muscular dystrophy”
4. Marzo 2012- luglio 2014 trial clinico GSK 114349, fase di estensione del precedente studio con farmaco GSK2402968 promuovente l'exon skipping dell'esone 51 del gene DMD. An open-label extension study of the long-term safety, tolerability and efficacy of GSK2402968 in subjects with Duchenne Muscular Dystrophy
5. Ottobre 2012-oggi trial clinico PTC124-GD-019-DMD “An Open-Label Study for Previously Treated Ataluren (PTC124®) Patients with Nonsense Mutation Dystrophinopathy”



**UNIVERSITÀ DI MILANO**  
**“CENTRO DINO FERRARI”**

PER LA DIAGNOSI E LA TERAPIA DELLE MALATTIE  
NEUROMUSCOLARI E NEURODEGENERATIVE



**FONDAZIONE I.R.C.C.S. CA' GRANDA**  
**OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO**

FONDAZIONE DI RICOVERO E CURA A CARATTERE  
SCIENTIFICO DI NATURA PUBBLICA

6. Maggio 2013-oggi trial clinico DSC/11/2357/43 “A Two-Part Study to Assess the Safety and Tolerability, Pharmacokinetics, and Effects on Histology and Different Clinical Parameters of Givinostat in Ambulant Children with Duchenne Muscular Dystrophy”
7. Novembre 2013- oggi trial clinico H6D-MC-LVJJ “A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial of Tadalafil for Duchenne Muscular Dystrophy”
8. Ottobre 2013- oggi trial clinico PTC124-GD-020-DMD “A Phase 3 Efficacy and Safety Study of Ataluren (PTC124) in Patients with Nonsense Mutation Dystrophinopathy”
9. Dicembre 2014-oggi trial clinico PTC124-GD-020e-DMD “A Phase 3 Extension Study of Ataluren (PTC124) in patient with nonsense mutation dystrophinopathy”.
10. Risk factors for bone loss and fractures in boys affected by duchenne muscular dystrophy: form genetics to treatment (RisBO-DMD). IRCCS E. Medea Bosisio Parini PI M.G. D'Angelo
11. Santhera-DELOS SNT III- IDEBENONE IRCCS E. Medea Bosisio Parini PI M.G. D'Angelo

**Elenco pubblicazioni del nostro gruppo di ricerca inerenti alla Distrofia Muscolare di Duchenne**

- 1) Mazzone ES, Messina S, Vasco G, Main M, Eagle M, D'Amico A, Doglio L, Politano L, Cavallaro F, Frosini S, Bello L, Magri F, Corlatti A, Zucchini E, Brancalion B, Rossi F, Ferretti M, Motta MG, Cecio MR, Berardinelli A, Alfieri P, Mongini T, Pini A, Astrea G, Battini R, Comi G, Pegoraro E, Morandi L, Pane M, Angelini C, Bruno C, Villanova M, Vita G, Donati MA, Bertini E, Mercuri E. Reliability of the North Star Ambulatory Assessment in a multicentric setting. *Neuromuscul Disord* 2009 Jul;19(7):458-61. (IF: 2.797; cit: 20)
- 2) Magri F, Govoni A, D'Angelo MG, Del Bo R, Ghezzi S, Sandra G, Turconi AC, Sciacco M, Ciscato P, Bordoni A, Tedeschi S, Fortunato F, Lucchini V, Bonato S, Lamperti C, Coviello D, Torrente Y, Corti S, Moggio M, Bresolin N, Comi GP. Genotype and phenotype characterization in a large dystrophinopathic cohort with extended follow-up. *J Neurol*. 2011 Mar 12. (IF: 3.473; cit: 9)



**UNIVERSITÀ DI MILANO**  
**“CENTRO DINO FERRARI”**

PER LA DIAGNOSI E LA TERAPIA DELLE MALATTIE  
NEUROMUSCOLARI E NEURODEGENERATIVE



**FONDAZIONE I.R.C.C.S. CA' GRANDA**  
**OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO**

FONDAZIONE DI RICOVERO E CURA A CARATTERE  
SCIENTIFICO DI NATURA PUBBLICA

- 3) Magri F, Del Bo R, D'Angelo MG, Govoni A, Ghezzi S, Gandossini S, Sciacco M, Ciscato P, Bordoni A, Tedeschi S, Fortunato F, Lucchini V, Cereda M, Corti S, Moggio M, Bresolin N, Comi GP. Clinical and molecular characterization of a cohort of patients with novel nucleotide alterations of the Dystrophin gene detected by direct sequencing. *BMC Med Genet* 2011 Mar 11;12:37. (IF: 2.328; cit: 5).
- 4) D'Angelo MG, Romei M, Lo Mauro A, Marchi E, Gandossini S, Bonato S, Comi GP, Magri F, Turconi AC, Pedotti A, Bresolin N, Aliverti A. Respiratory pattern in an adult population of dystrophic patients. *J Neurol Sci.* 2011 Jul 15;306(1-2):54-61. (IF: 2.353; cit: 3).
- 5) D'Angelo MG, Lorusso ML, Civati F, Comi GP, Magri F, Del Bo R, Guglieri M, Molteni M, Turconi AC, Bresolin N. Neurocognitive profiles in duchenne muscular dystrophy and gene mutation site. *Pediatr Neurol.* 2011 Nov;45(5):292-9. (IF: 1.522; cit: 0)
- 6) D'Angelo MG., Gandossini S., Martinelli Boneschi F., Sciorati C., Bonato S., Brighina E., Comi G.P., Turconi A., Magri F., Stefanoni G., Brunelli S., Baldelli S., Bresolin N., Cattaneo D., Clementi E., Nitric oxide donor and anti inflammatory drugs: a pilot safety study in muscular dystrophies *Pharmacological Research* 2012 Apr;65(4):472-9. (IF: 4.436; cit: 6)
- 7) Bello L, Piva L, Barp A, Taglia A, Picillo E, Vasco G, Pane M, Previtali SC, Torrente Y, Gazzero E, Motta MC, Grieco GS, Napolitano S, Magri F, D'Amico A, Astrea G, Messina S, Sframeli M, Vita GL, Boffi P, Mongini T, Ferlini A, Gualandi F, Soraru' G, Ermani M, Vita G, Battini R, Bertini E, Comi GP, Berardinelli A, Minetti C, Bruno C, Mercuri E, Politano L, Angelini C, Hoffman EP, Pegoraro E. Importance of SPP1 genotype as a covariate in clinical trials in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology.* 2012 Jul 10;79(2):159-62. (IF: 8.312; cit: 1)
- 8) Mazzone ES, Pane M, Sormani MP, Scalise R, Berardinelli A, Messina S, Torrente Y, D'Amico A, Doglio L, Viggiano E, D'Ambrosio P, Cavallaro F, Frosini S, Bello L, Bonfiglio S, De Sanctis R, Rolle E, Bianco F, Magri F, Rossi F, Vasco G, Vita G, Motta MC, Donati MA, Sacchini M, Mongini T, Pini A, Battini R, Pegoraro E, Previtali S, Napolitano S, Bruno C, Politano L, Comi GP, Bertini E, Mercuri E. 24 month longitudinal data in ambulant boys with duchenne muscular dystrophy. *PLoS One.* Jan 2013;8(1):e52512. (IF: 4.092; cit: 0)
- 9) Govoni A, Magri F, Brajkovic S, Zanetta C, Faravelli I, Corti S, Bresolin N, Comi GP. Ongoing therapeutic trials and outcome measures for Duchenne muscular dystrophy. *Cell Mol Life Sci.* 2013 Jun 18.



**UNIVERSITÀ DI MILANO**  
**“CENTRO DINO FERRARI”**

PER LA DIAGNOSI E LA TERAPIA DELLE MALATTIE  
NEUROMUSCOLARI E NEURODEGENERATIVE



**FONDAZIONE I.R.C.C.S. CA' GRANDA**  
**OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO**

FONDAZIONE DI RICOVERO E CURA A CARATTERE  
SCIENTIFICO DI NATURA PUBBLICA

- 10) Pane M, Mazzone ES, Sormani MP, Messina S, Vita GL, Fanelli L, Berardinelli A, Torrente Y, D'Amico A, Lanzillotta V, Viggiano E, D'Ambrosio P, Cavallaro F, Frosini S, Bello L, Bonfiglio S, Scalise R, De Sanctis R, Rolle E, Bianco F, Van der Haawue M, Magri F, Palermo C, Rossi F, Donati MA, Alfonsi C, Sacchini M, Arnoldi MT, Baranello G, Mongini T, Pini A, Battini R, Pegoraro E, Previtali SC, Napolitano S, Bruno C, Politano L, Comi GP, Bertini E, Morandi L, Gualandi F, Ferlini A, Goemans N, Mercuri E. 6 minute walk test in Duchenne MD patients with different mutations: 12 month changes. PLoS One. 2014 Jan 8;9(1):e83400.
- 11) Pane M, Mazzone ES, Sivo S, Sormani MP, Messina S, D'Amico A, Carlesi A, Vita G, Fanelli L, Berardinelli A, Torrente Y, Lanzillotta V, Viggiano E, D'Ambrosio P, Cavallaro F, Frosini S, Barp A, Bonfiglio S, Scalise R, De Sanctis R, Rolle E, Graziano A, Magri F, Palermo C, Rossi F, Donati MA, Sacchini M, Arnoldi MT, Baranello G, Mongini T, Pini A, Battini R, Pegoraro E, Previtali S, Bruno C, Politano L, Comi GP, Bertini E, Mercuri E. Long term natural history data in ambulant boys with Duchenne muscular dystrophy: 36-month changes. PLoS One. 2014 Oct 1;9(10):e108205. doi: 10.1371/journal.pone.0108205. eCollection 2014.
- 12) Bushby K(1), Finkel R, Wong B, Barohn R, Campbell C, Comi GP, Connolly AM, Day JW, Flanigan KM, Goemans N, Jones KJ, Mercuri E, Quinlivan R, Renfroe JB, Russman B, Ryan MM, Tulinius M, Voit T, Moore SA, Lee Sweeney H, Abresch RT, Coleman KL, Eagle M, Florence J, Gappmaier E, Glanzman AM, Henricson E, Barth J, Elfring GL, Reha A, Spiegel RJ, O'donnell MW, Peltz SW, McDonald CM; PTC124-GD-007-DMD STUDY GROUP. Ataluren treatment of patients with nonsense mutation dystrophinopathy. Muscle Nerve. 2014 Oct;50(4):477-87. (as member of the study group)
- 13) Buyse GM, Voit T, Schara U, Straathof CS, D'Angelo MG, Bernert G, Cuisset JM, Finkel RS, Goemans N, McDonald CM, Rummey C, Meier T; DELOS Study Group. Efficacy of idebenone on respiratory function in patients with Duchenne muscular dystrophy not using glucocorticoids (DELOS): a double-blind randomised placebo-controlled phase 3 trial. Lancet. 2015 May 2;385(9979):1748-57.
- 14) Lorenzo Peverelli, Silvia Testolin, Luisa Villa, Adele D'Amico, Stefania Petrini, Chiara Favero, Francesca Magri, Lucia Morandi, Marina Mora, Tiziana Mongini, Enrico Bertini, Monica Sciacco, Giacomo P. Comi, Maurizio Moggio. Evaluation of muscle changes in DMD patients: a longitudinal study. Submitted to Neurology

Milano, 15 Giugno 2015