
La terapia genica delle malattie ereditarie umane con vettori AAV

Prof. Alberto Auricchio

Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali,
Universita' "Federico II"

e

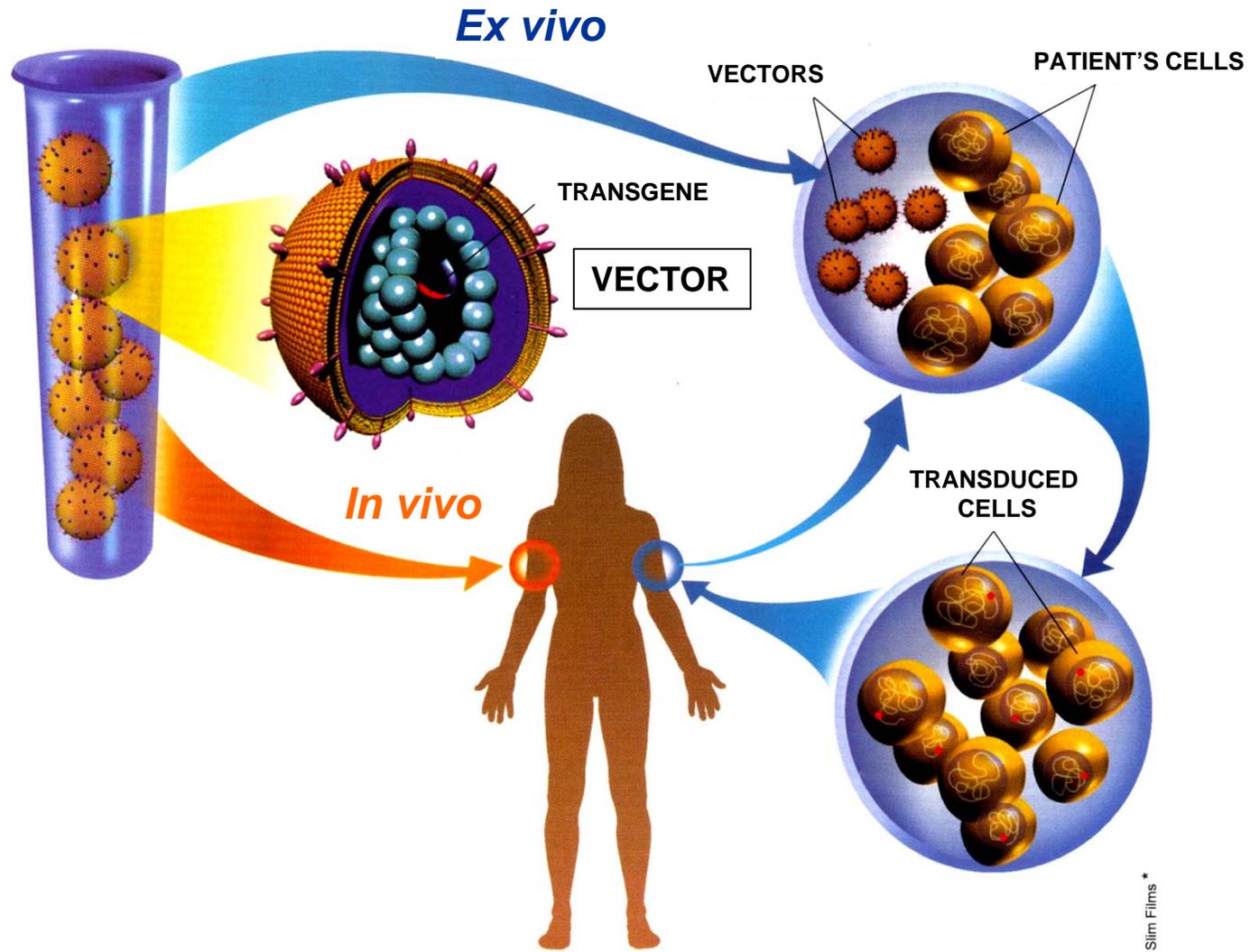
Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM)
Napoli



Terapia genica delle malattie ereditarie

- utilizza acidi nucleici [DNA e RNA] come farmaci
- introduce copia corretta di gene in cellule che hanno copia difettosa

TERAPIA GENICA



Trasferimento Genico

Metodi per Introdurre Acidi Nucleici in Cellule

Vettore = Agente che permette l'ingresso del Gene
Terapeutico

Vettori Virali

Interazione con un Recettore della Cellula Bersaglio

Vettori Non Virali

Interazione Fisica con la Membrana Cellulare

Infezione (Virus) → Trasduzione (Vettore)

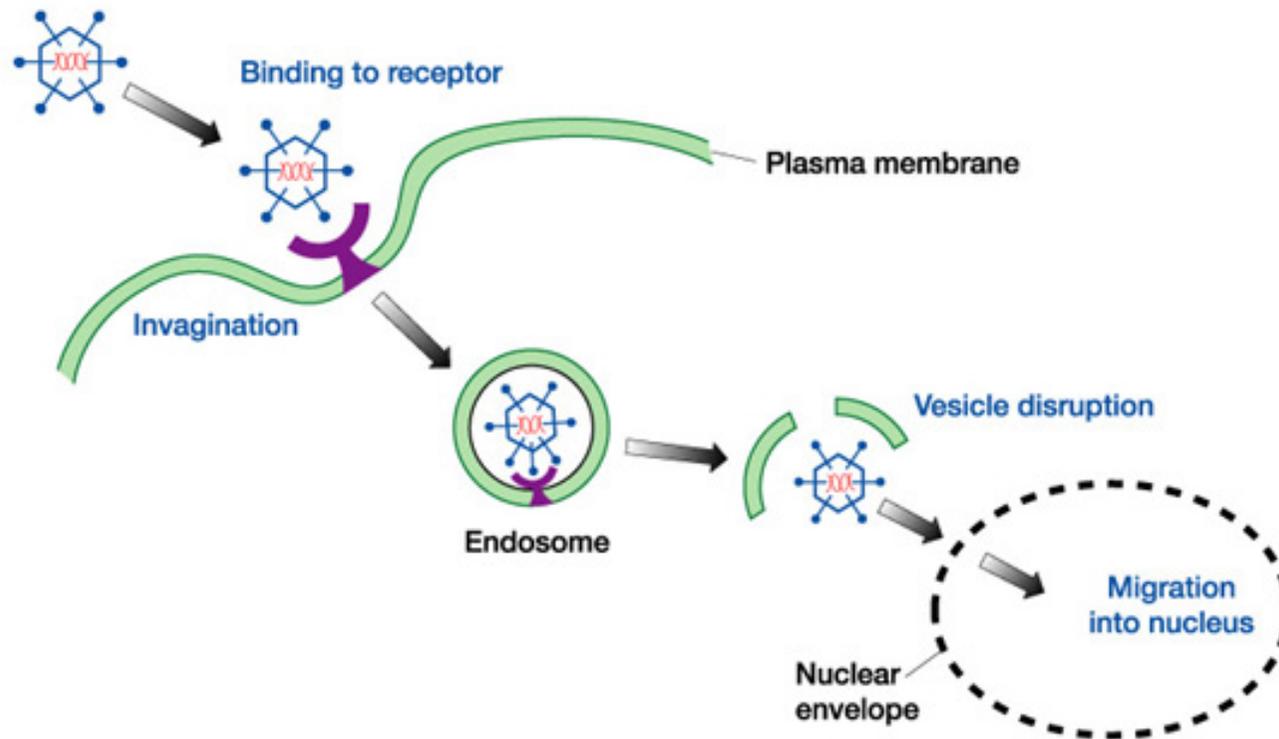


Figure 21-9 Human Molecular Genetics, 3/e. (© Garland Science 2004)

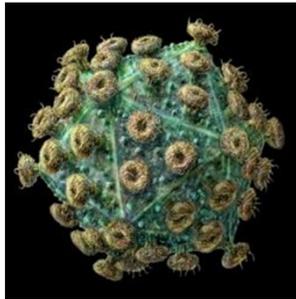
Vettori virali per terapia genica

I virus sono vettori evoluti in maniera naturale per trasportare materiale genetico all'interno di cellule

Ciclo virale

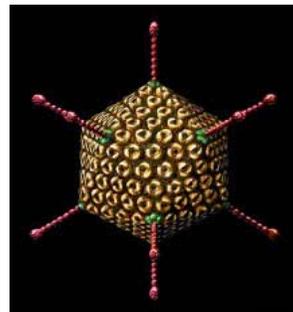
~~Infezione / Replicazione~~

Terapia genica basata su vettori virali



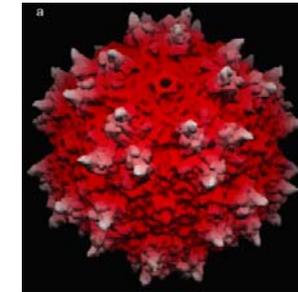
Lentivirus

Trasduzione di cellule in divisione e non, integra nel genoma ospitante



Adenovirus

Trasduzione episomale di cellule in divisione e non



Adeno-Associated virus

Trasduzione, prevalentemente episomale, di cellule in divisione e non

Dimensione delle particelle (nm):

80-100

80-120

25

Capacita' di clonaggio (kb):

8

37

4.7

Vettori AAV per il trasferimento di geni in vivo

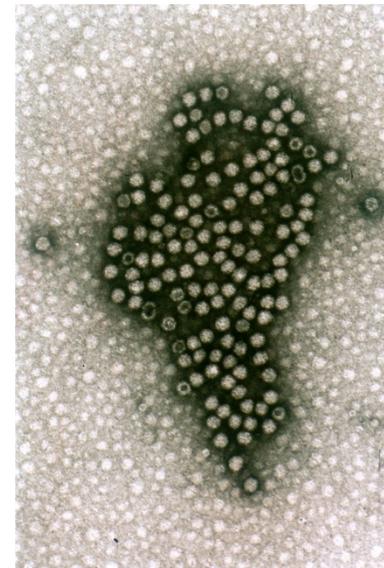
Vantaggi

- Derivano da virus a DNA non patogeni per l'uomo
- Trasducono efficientemente cellule quiescenti e differenziate
- Tempo di trasduzione lungo dopo la singola somministrazione del vettore

- Buon livello di sicurezza nell'uomo
- Molti sierotipi disponibili

Svantaggi

- Limitata capacità di trasporto di DNA



Sindrome di Maroteaux-Lamy o mucopolisaccaridosi di tipo VI (MPS VI)

- Colpisce 1 su 100.000/300.000 nati vivi
- Malattia metabolica, autosomica recessiva

- Causata dal deficit di N-acetylgalactosamine-4-solfatasi (arilsolfatasi B, ARSB)
- Principali prodotti accumulati: mucopolisaccaridi, in particolare dermatan solfato
- Diagnosi nella prima infanzia basata sulla valutazione di ARSB e GAG urinari



Ossa e cartilagini : Ritardo nello sviluppo osseo – Disostosi multipla - Macrocefalia – Schiacciamento del ponte nasale e ingrossamento delle labbra - Torace deformato - Rigidità articolare

Organi splancnici: Epatomegalia – Addome sporgente

Cuore: Disfunzione delle valvole aortica e mitrale

Occhi: Opacità corneale

**COINVOLGIMENTO PRIMARIO DEL SISTEMA NERVOSO
CENTRALE ASSENTE**

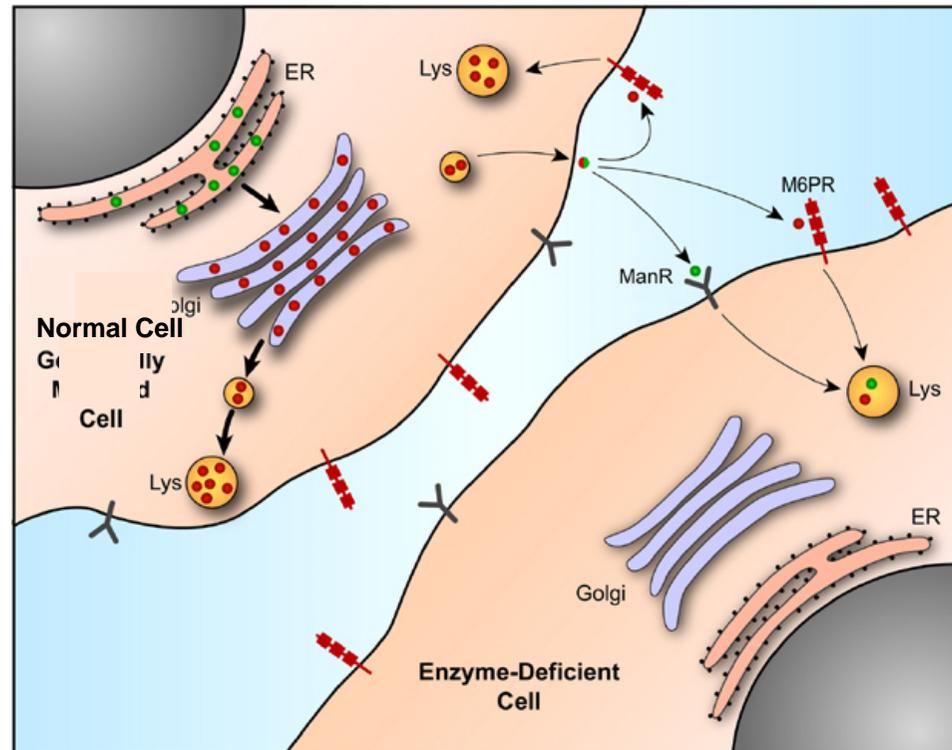


Perche' proprio MPS VI?

- Malattia grave con terapia imperfetta
- Disponibilita' di una finestra temporale ampia per intervenire
- Teoricamente bassi livelli di enzima sono sufficienti a curare
- Disponibilita' di modelli animali su quali testare terapie
- Disponibilita' di parametri biochimici che si possono misurare facilmente nel sangue o nelle urine per capire una terapia sta funzionando
- Gruppo di malattie sul quale il TIGEM lavora da anni e ha raccolto molte risorse
- Ed infine...

Le basi della terapia per malattie da accumulo lisosomiale

Secrezione e prelievo



Cross-correzione

Terapia standard per MPS VI: terapia enzimatica sostitutiva

Maggio 2005: Approvazione FDA

Gennaio 2006: Approvazione EMA

Infusioni settimanali di ARSB umana ricombinante (1mg/kg)



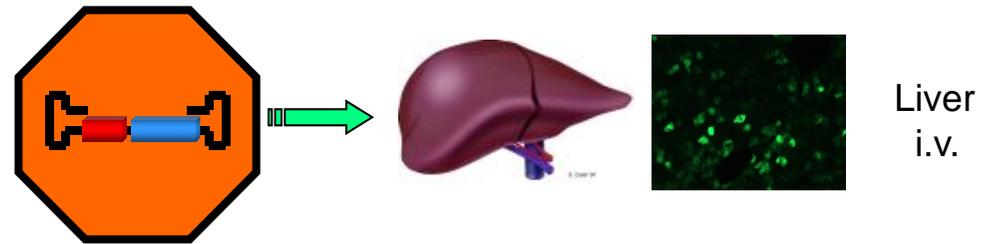
Naglazyme[®]
(GALSULFASE)

BIOMARIN[™]
MATCHING PROTEIN SCIENCE WITH PATIENT NEEDS

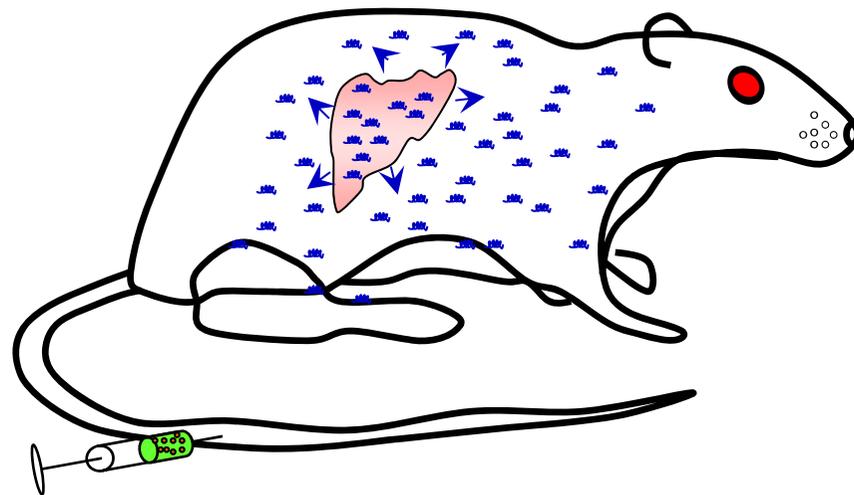
Novato, CA



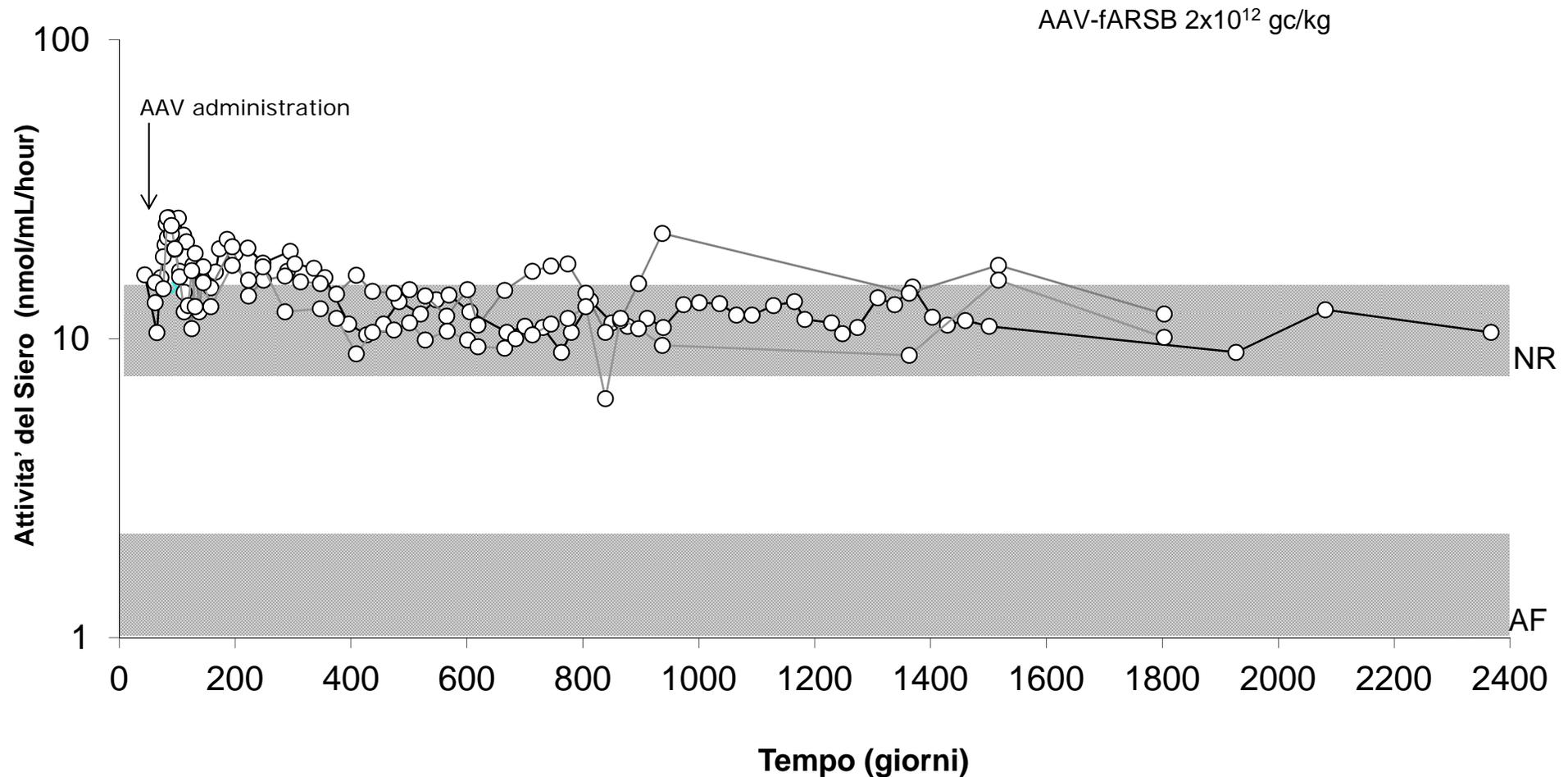
Terapia genica *in vivo* con AAV2/8-TBG per trasdurre il fegato



AAV2/8-TBG-ARSB



L' attivita' sierica di ARSB e' stabile per un lungo periodo (>6 anni) in gatti affetti da MPS VI che hanno ricevuto una singola somministrazione sistemica di AAV2/8

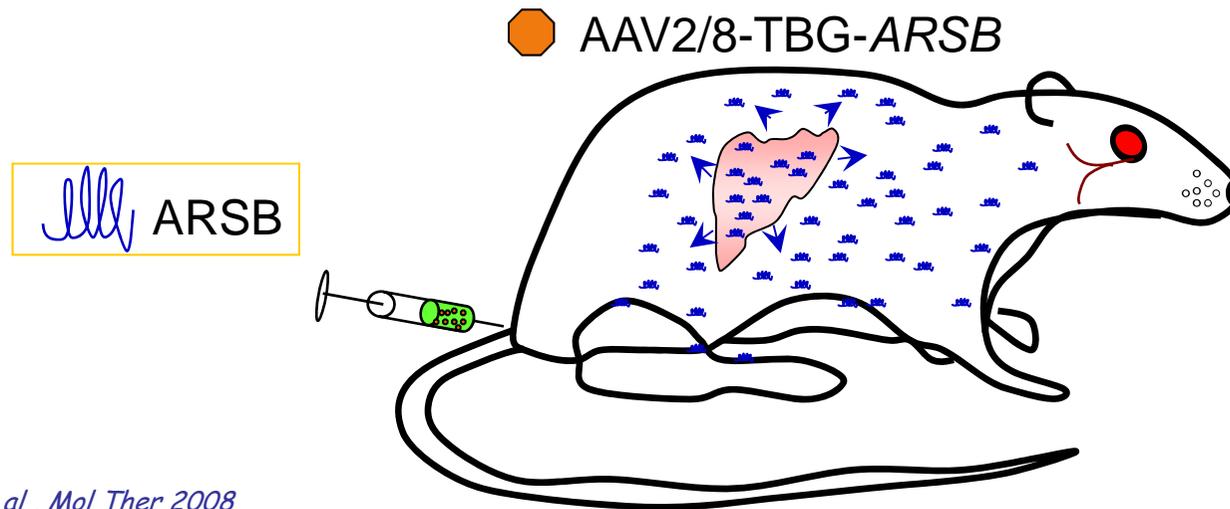


Ferla and Auricchio, unpublished data

10/28/2016



Terapia genica *in vivo* con AAV2/8-TBG per trasdurre il fegato



Tessitore et al, Mol Ther 2008
Tessitore et al, Pathogenetics 2009
Cotugno et al, Hum Gene Ther 2010
Cotugno et al, Mol Ther. 2011
Cotugno et al, PLoS ONE, 2011
Ferla et al. Hum Gene Ther 2013
Ferla et al. Hum Gene Ther 2014

Effetti biochimici:
Attività enzimatica
GAG

Effetti morfologici:
Istopatologia
Radiografia dello scheletro
Ecografia del cuore

Effetti funzionali:
Attività motoria

L'attività motoria e' migliorata in gatti affetti da MPS VI trattati con AAV2/8-TBG-ARSB

NR



MPS VI



MPS VI + AAV at P50





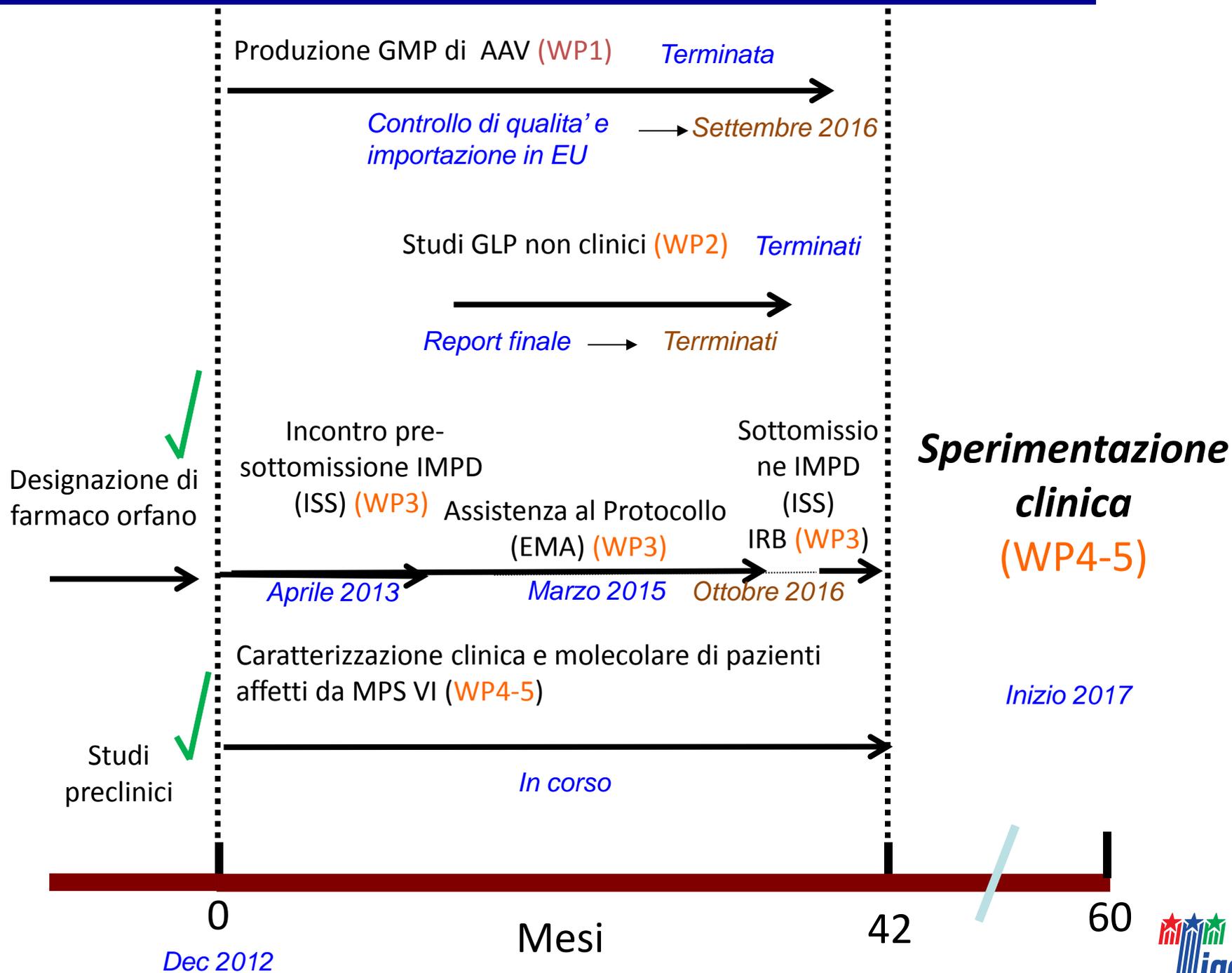
STUDIO CLINICO DI TERAPIA GENICA PER MPS VI UNA GRAVE MALATTIA DA ACCUMULO LISOSOMIALE

WP1: GMP AAV : ReGenX (USA)

WP2: Studi non clinici GLP: TIGEM (IT), Genosafe (Fr)

WP3: Aspetti regolatori: TIGEM (IT)

WP4: Studio clinico: DiSMET (IT), Erasmus University (NL),
Haccetepe University (TR)

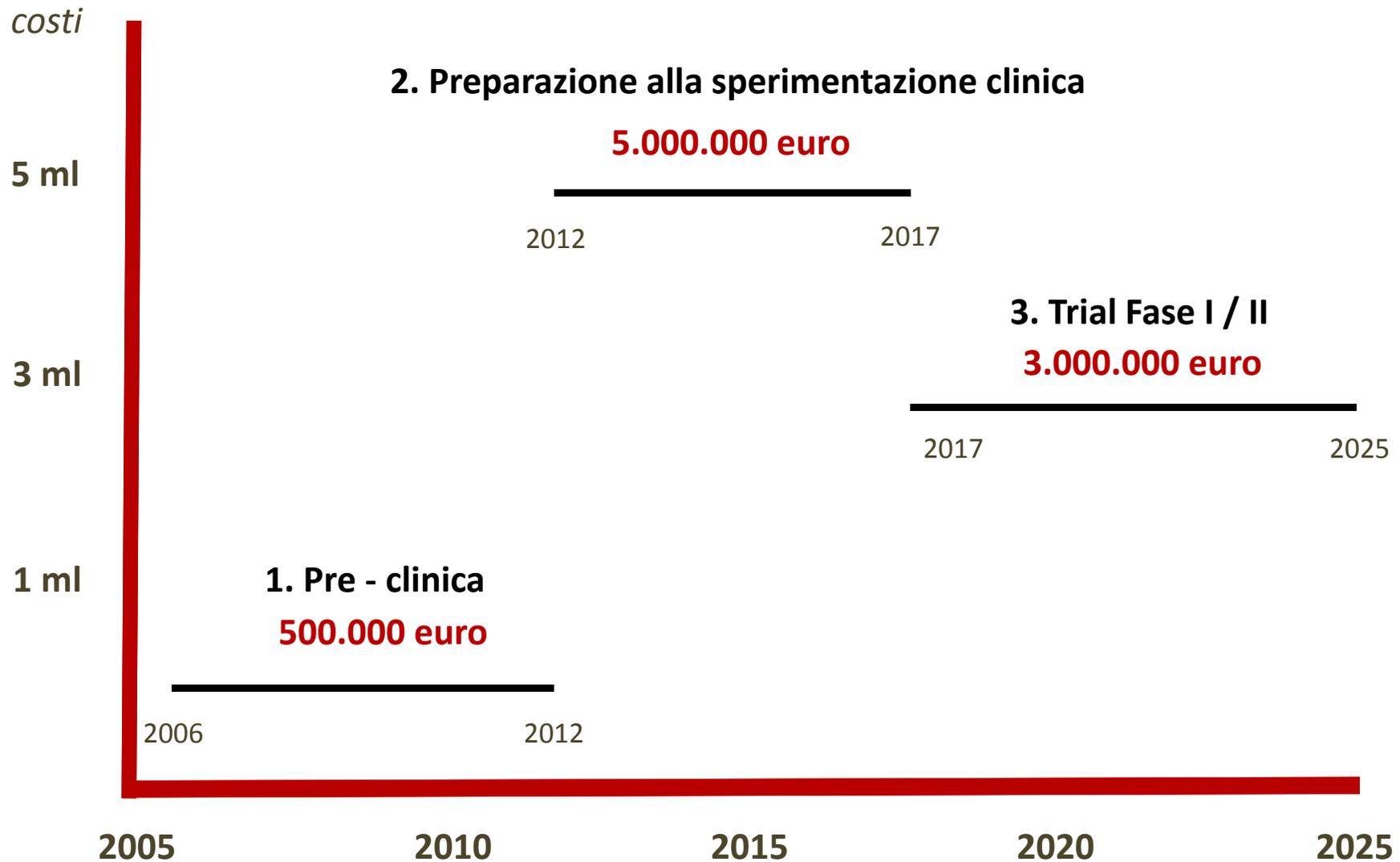


Malattie ereditarie incurabili della retina

Le degenerazioni ereditarie della retina (DER) causano cecita' in 250.000 individui in Europa:

- Retinite pigmentosa: 1:3.500
- Amaurosi congenita di Leber: 1:30.000
- Malattia di Stargardt: 1:10.000

Tempi e costi della terapia genica traslazionale: l'esempio del progetto MPS VI



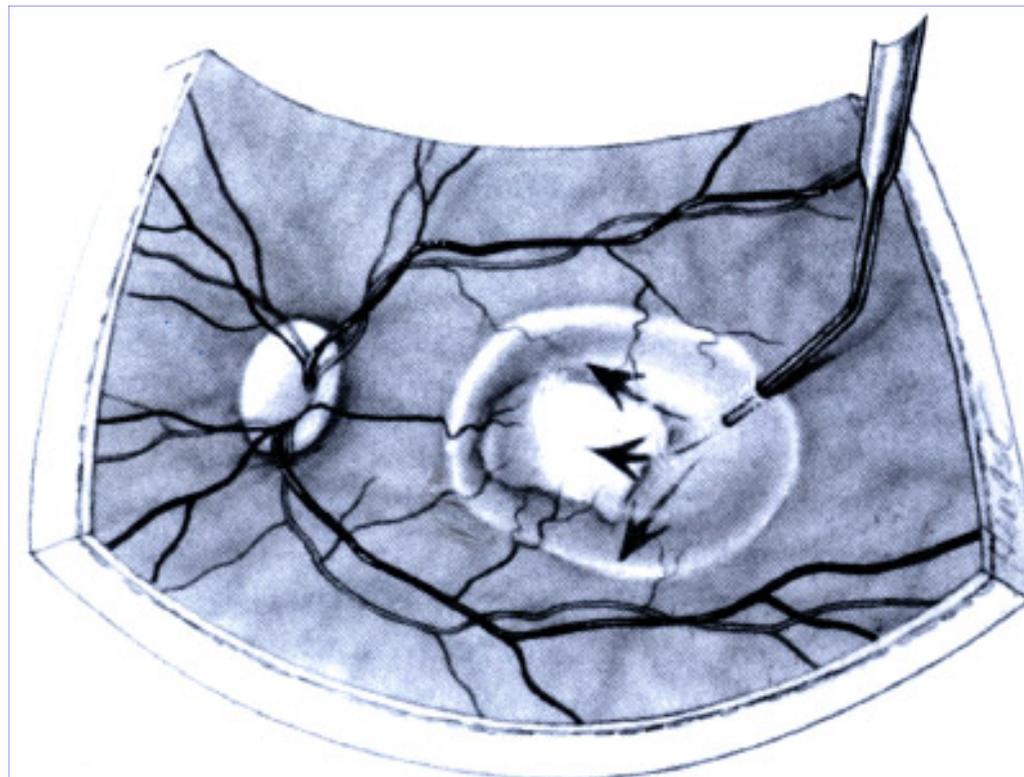
Amaurosi congenita di Leber

- **Autosomica Recessiva**
- **Distrofia retinica ad esordio precoce**
- **Nessun trattamento**
- **17 geni coinvolti: alta eterogeneita' genetica**
- **In 10-20% dei casi e' mutato il gene RPE65**
- **Modelli animali disponibili**



Iniezioni subretina

Approccio trans-vitreal



Visus recuperato stabilmente per oltre 11 anni in un modello spontaneo di LCA dopo la singola somministrazione subretina di vettore virale

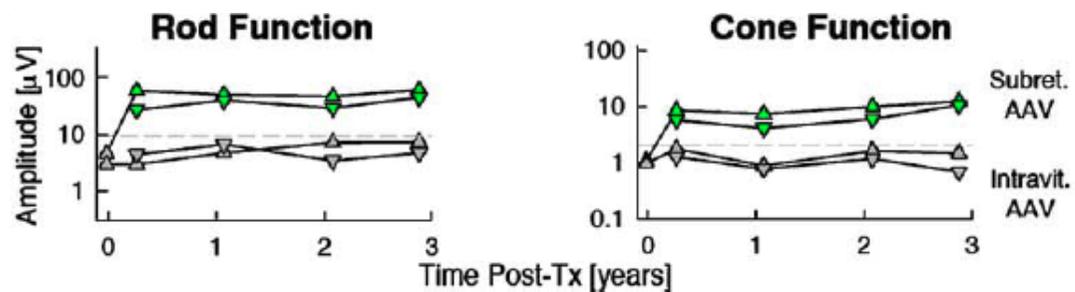
 © 2001 Nature Publishing Group <http://genetics.nature.com>

letter



Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness

Gregory M. Acland¹, Gustavo D. Aguirre¹, Jharna Ray¹, Qi Zhang¹, Tomas S. Aleman², Artur V. Cideciyan², Susan E. Pearce-Kelling¹, Vibha Anand², Yong Zeng², Albert M. Maguire², Samuel G. Jacobson², William W. Hauswirth³ & Jean Bennett²



Il problema della eterogeneita' genetica per le malattie della retina

- Piu' di 200 geni coinvolti
- Difficile identificazione del gene coinvolto
- Senza diagnosi molecolare non e' possibile sottoporsi ad una terapia genica che sia gene-specifica
- Pochi sono i centri dove si offre una competente diagnosi clinica affiancata da indagini molecolari adeguate

CONSORZIO CHOP-PENN/TIGEM-SUN/U-GHENT

- University of Pennsylvania School of Medicine
 - F.M. Kirby Center for Molecular Ophthalmology, Scheie Eye Institute
 - Ophthalmology, Pediatrics, Medicine, Pathology and Laboratory Medicine
- The Children's Hospital of Philadelphia
 - Center for Cellular and Molecular Therapeutics
 - Department of Ophthalmology
- Department of Ophthalmology, Seconda Università degli Studi di Napoli
- Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM)
- Medical Genetics, Department of Pediatrics, "Federico II" University, Naples, Italy
- Ghent University, Belgium



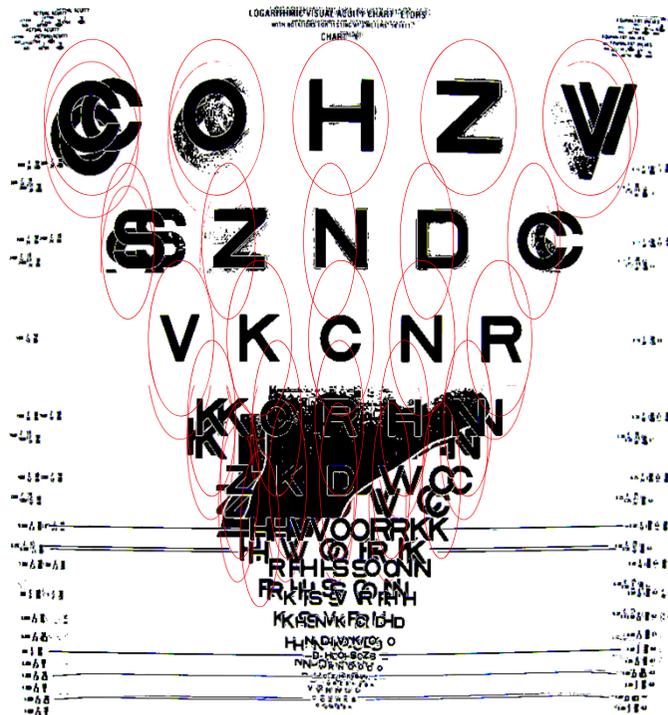
Disegno dello studio di fase I

- Singola iniezione subretina di AAV2.hRPE65v2 nell'occhio con funzione visiva peggiore
- Legalmente ciechi (acuita' visiva, campi visivi)
- Mutazioni RPE65
- 8 anni o al di sopra
- Possibilita' di dare consenso/assenso+permesso dei genitori
- Si inizia con la dose piu' bassa corrispondente alla dose minima che ha mostrato efficacia in pre-clinica
- Disponibili per un lungo follow-up

Acuita' visiva

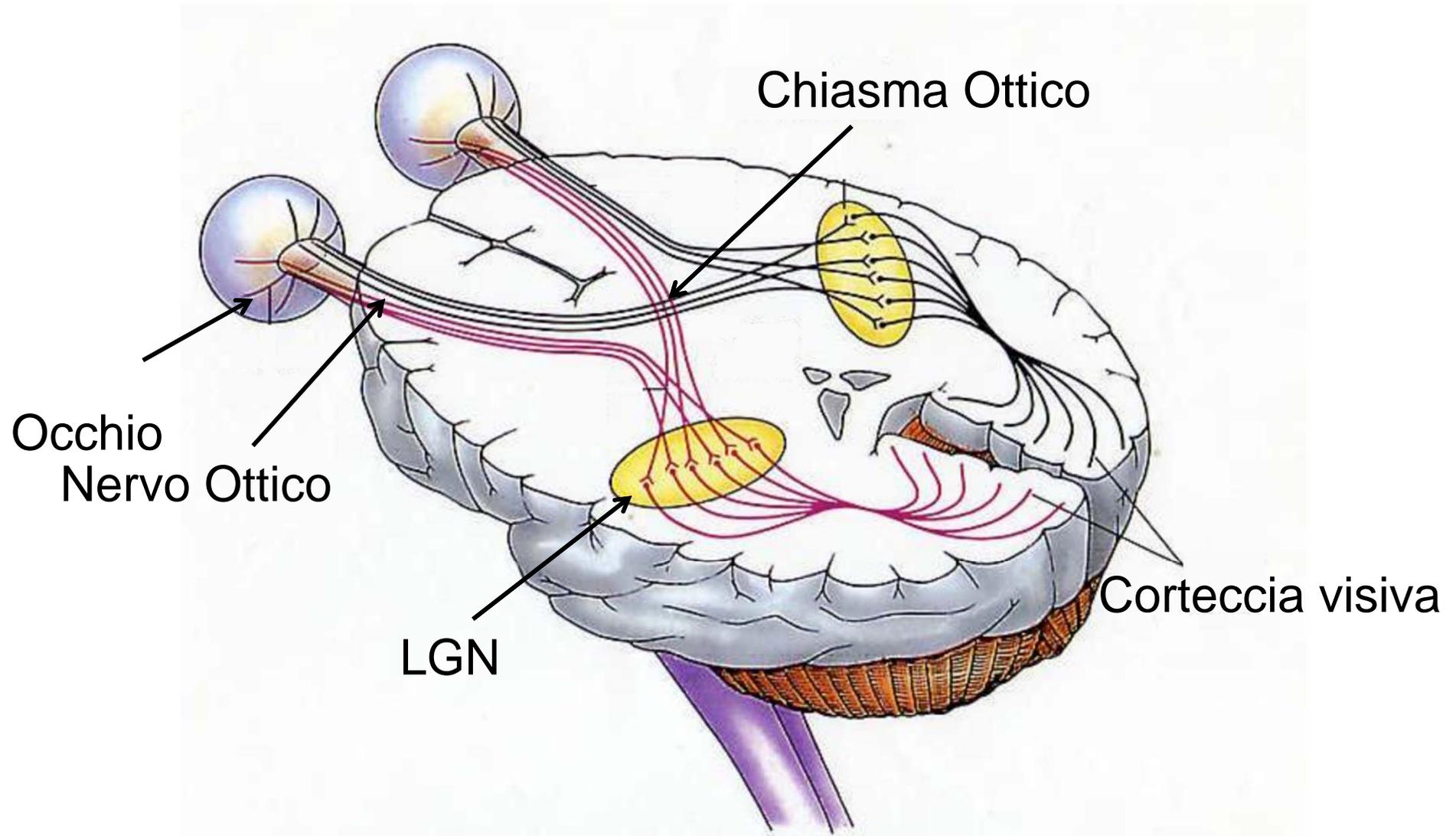
(50 cm)

3 years

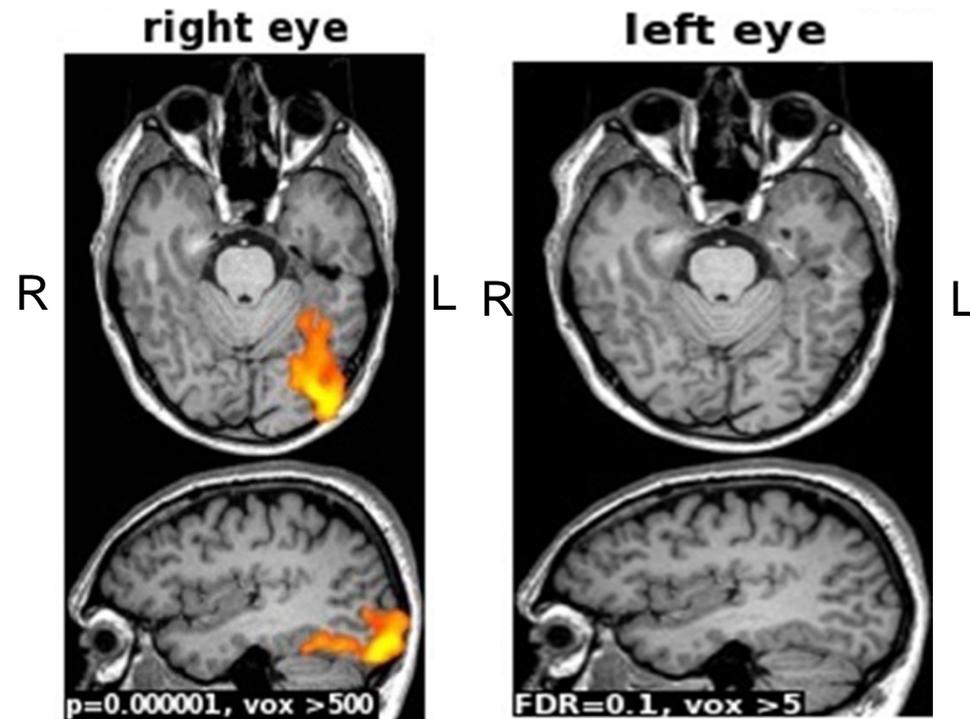
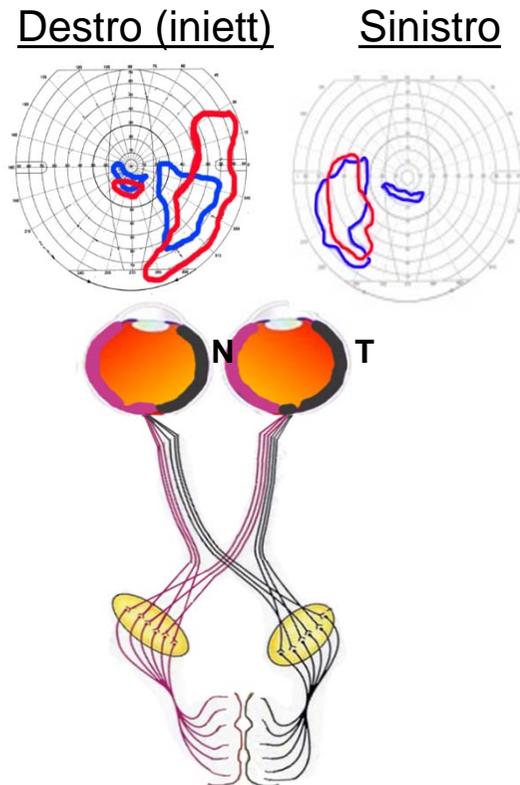


NPO2

Mappaggio delle aree visive con risonanza magnetica funzionale (fMRI)



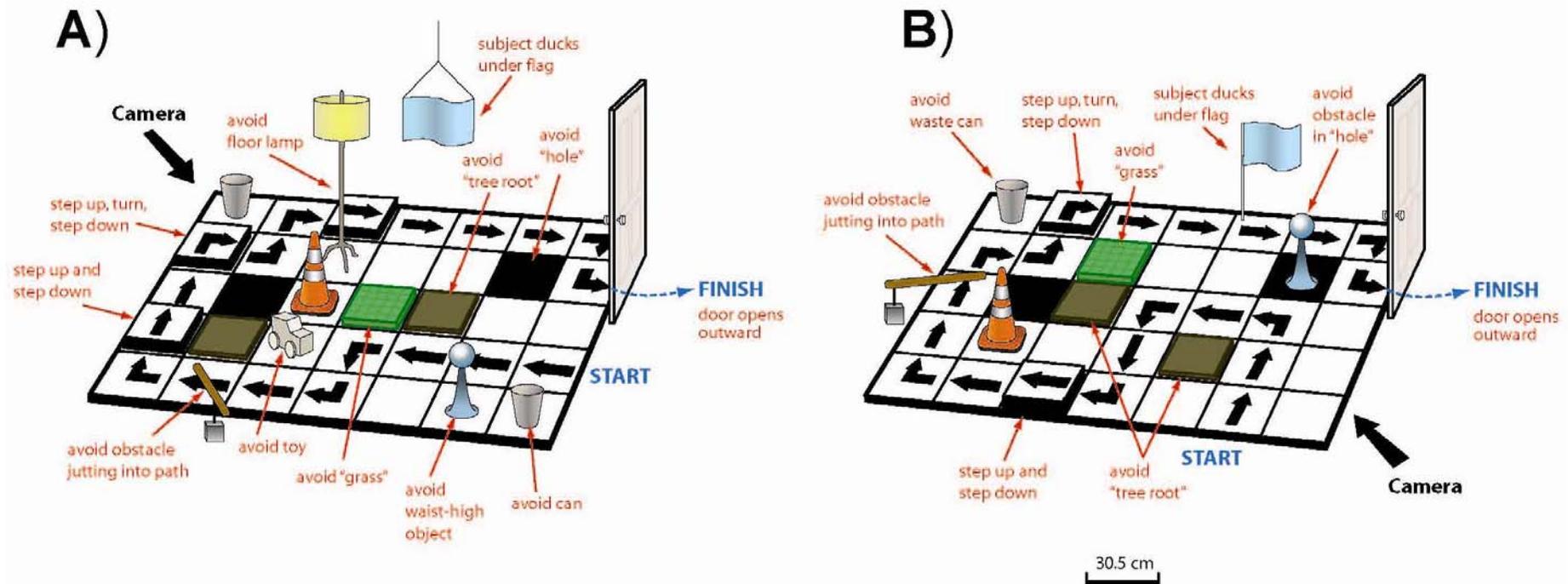
Durante risonanza magnetica, l'area di attivita' corticale corrisponde al campo visivo/sito di iniezione



Ashtari et al, JCI, 2011

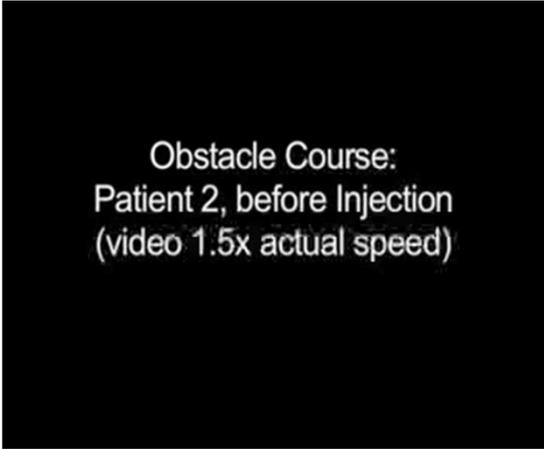
Le vie ottiche sono intatte e possono essere riattivate

Test di mobilita'



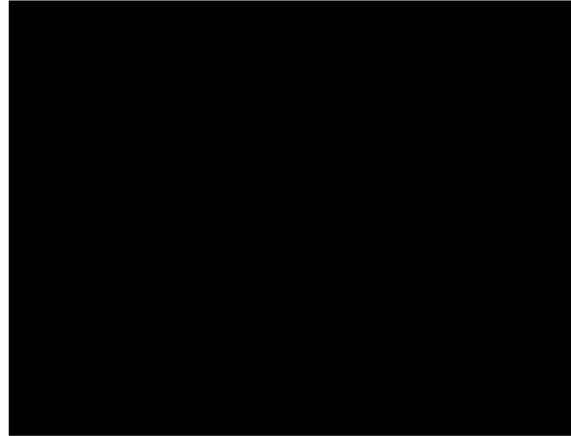
Maguire & Simonelli et al, NEJM
358:2240-2248 (2008).

Alcuni soggetti riescono a camminare in un percorso con ostacoli



Obstacle Course:
Patient 2, before Injection
(video 1.5x actual speed)

pre-trattamento



post-trattamento I occhio



NP01 FO Day 30
Left Eye
50 lux
(three times
original speed)

post-trattamento II occhio

$P=0.002$

Maguire & Simonelli et al, NEJM
358:2240-2248 (2008).

Conclusioni

- **Il trattamento ha un ottimo profilo di sicurezza** (Maguire et al, NEJM, 2008)
- **Il miglioramento della funzione visiva e' mantenuto per almeno 3 anni** (Maguire et al, Lancet 2009, Simonelli et al, Mol. Ther. 2010, Testa et al, Ophthalmology, 2012)



A Leap Forward: Spark Therapeutics Seeks FDA Approval for its Vision-Restoring Gene Therapy

By Dr. Steve Rose on October 8, 2015



We're approaching a critical milestone in the fight against blinding retinal diseases, and it has the potential to tremendously boost and accelerate the advancement of virtually all [gene therapies](#) in development for dozens of inherited retinal diseases.

Sometime in 2016, [Spark Therapeutics](#) will request marketing approval from the [U.S. Food and Drug Administration](#) (FDA) for its landmark gene therapy for retinal conditions caused by mutations in the gene RPE65, namely certain forms of [Leber congenital amaurosis](#) and [retinitis pigmentosa](#).

The request, formally known as a [biologics license application](#), or BLA, comes on the heels of [Spark's announcement](#) earlier this

week that its Phase III trial of the treatment has delivered positive "top-line" results. Among other results, participants, after treatment, significantly improved their ability to navigate a mobility course in dim and bright settings. These individuals, who range in age from 4 to 44, were virtually blind before receiving the therapy.

There are no guarantees that the treatment will be approved, but given the clinical-trial safety and efficacy data reported over the last eight years, we have good reason to be cautiously optimistic. Approval would likely make it the first FDA-approved gene therapy for an eye disease or an inherited condition.



DONATE

REGULAR CONTRIBUTORS

Rich Shea

As the Foundation's Associate Director, Communications & Marketing, Rich writes and edits content for all of the Foundation's print and online publications, including its blog, Eye on the Cure. [Read More...](#)



WANT TO HEAR FROM THE FOUNDATION?

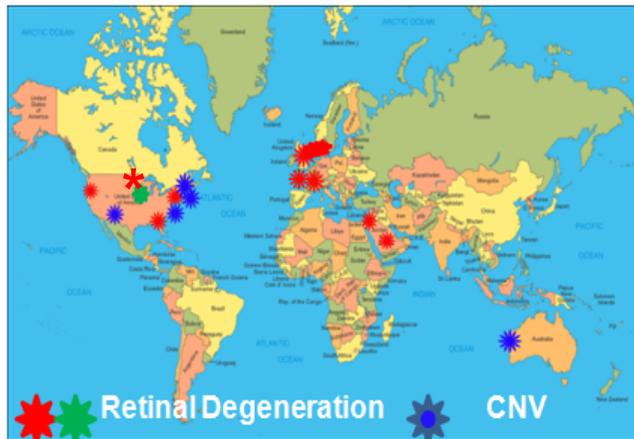
The Foundation Fighting
Blindness provides valuable
disease information

Prodotti di terapia genica sul mercato

- Glybera, vettore AAV per la terapia del deficit di lipoprotein lipasi
- Strimvelis, cellule del midollo geneticamente modificate per la cura di una grave immunodeficienza ereditaria

AAV nelle sperimentazioni cliniche sulla retina nel 2014

Administration Sites



	# Soggetti/Occhi con iniezioni di AAV
LCA-RPE65: CHOP Phase I/II	12
LCA-RPE65: UPenn/UFlorida Phase I	15
LCA-RPE65: Hadassah Medical Center Phase I	10
LCA-RPE65: Casey Inst Oregon Phase I/II	12
LCA-RPE65: UCL London Phase I/II	12
LCA-RPE65: Nantes, Phase I/II	9
LCA-RPE65: CHOP/Iowa Phase III	24
CNV: Genzyme	34
CNV: Avalanche	48
RP-MERTK Phase I	6
CHM: U Oxford (UK)	9
CHM: Toronto (Canada)	12
TOTAL	203



Courtesy of Dr. Jean Bennett

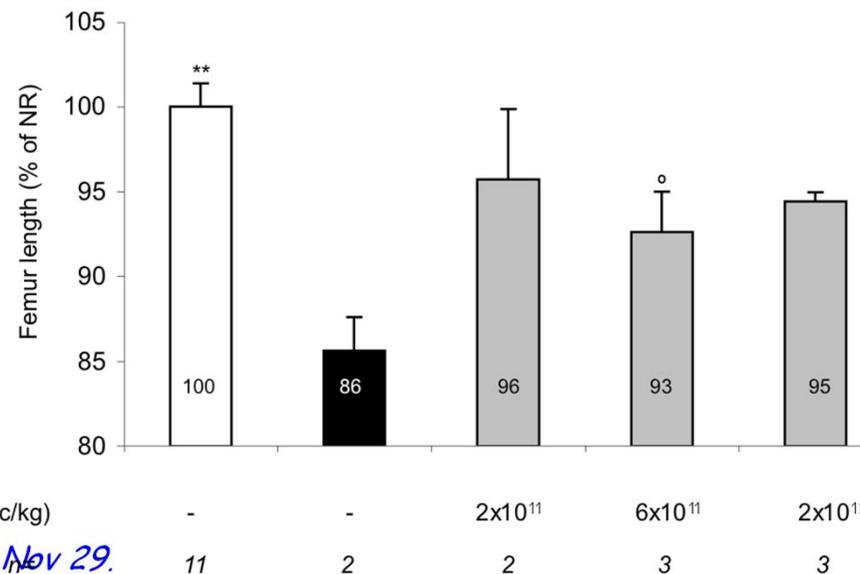
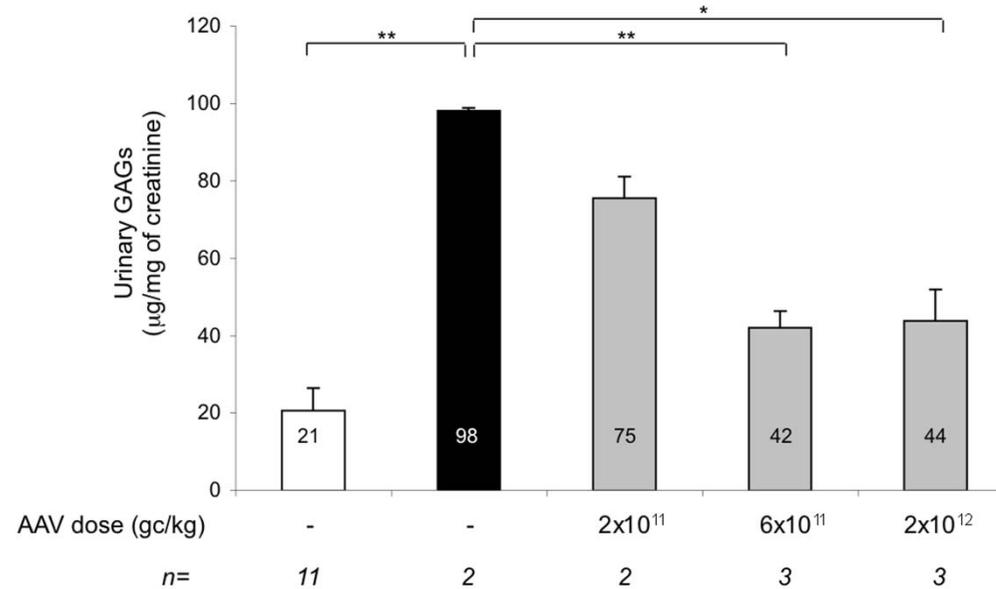
AAV nelle sperimentazioni cliniche sulla retina nel 2014

Neuropatia ottica ereditaria di Leber dovuta a mutazione del ND4 (n=2 studi): GeneSight; Univ. of Miami

Retinoschisi X-linked (n=2 studi): NEI, ATGC/Biogen



Riduzione dei livelli di GAG nelle urine e aumento della lunghezza del femore in gatti affetti da MPS VI e trattati con AAV2/8



Riduzione dello spessore della valvola mitralica in gatti affetti da MPS VI e trattati con AAV2/8

