



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Sindrome di Hutchinson Gilford: un approccio di terapia genica

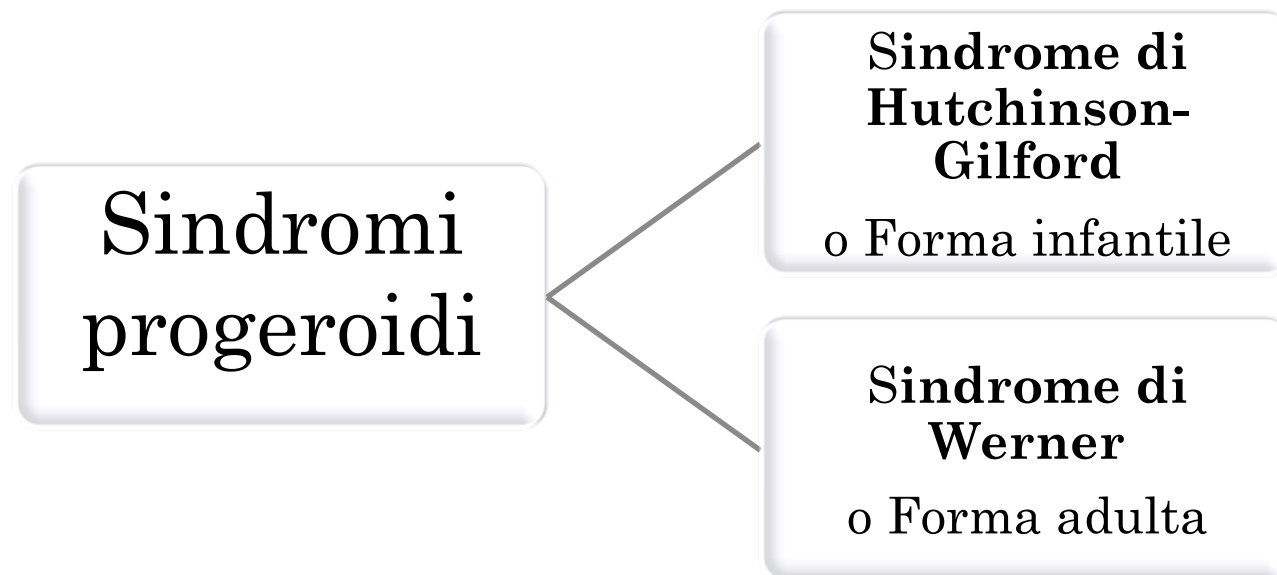
**Ivano Legnini
Jessica Lenzi
Sara Maiello
Silvia Stipo
Claudia Tita**

**aa 2010/2011
Corso di Terapia Genica
Prof.ssa Isabella Saggio**

SINDROMI PROGEROIDI

**Malattie genetiche rare,
caratterizzate da un
invecchiamento precoce che
portano a morte prematura del
soggetto colpito**

SINDROMI PROGEROIDI

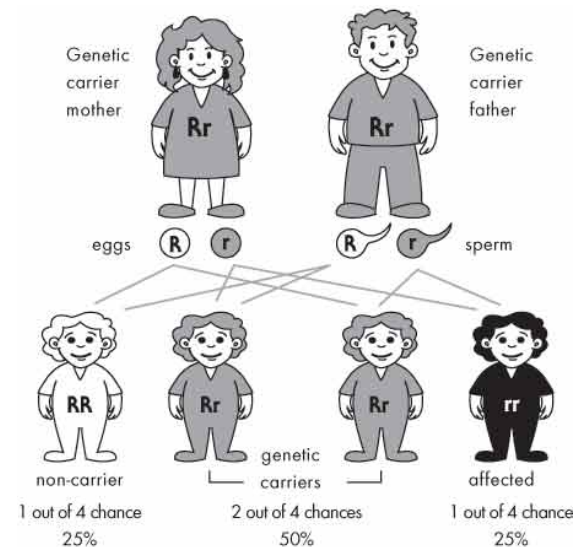


Review: Brian A. Kudlow et al 2007

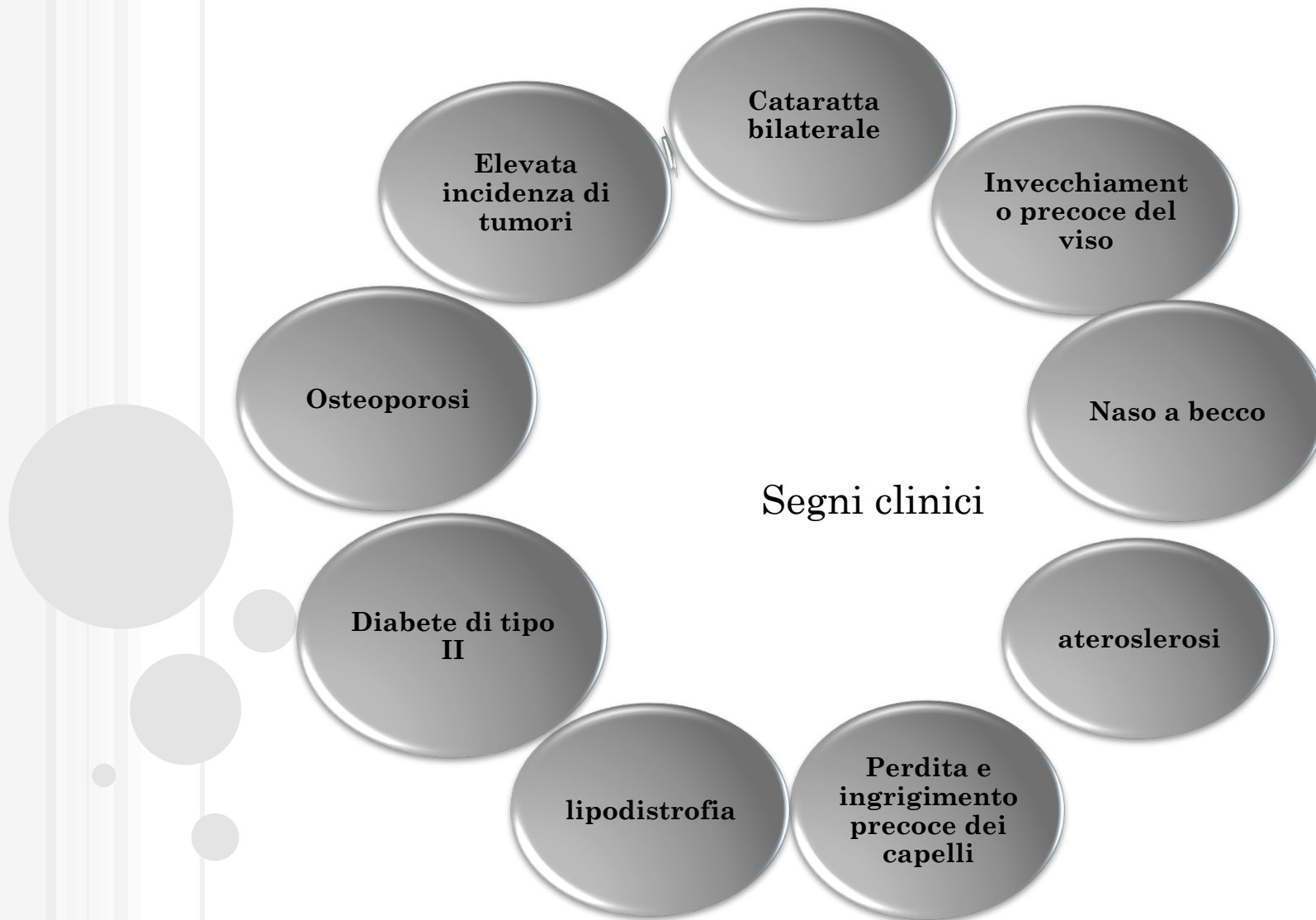


SINDROME DI WERNER

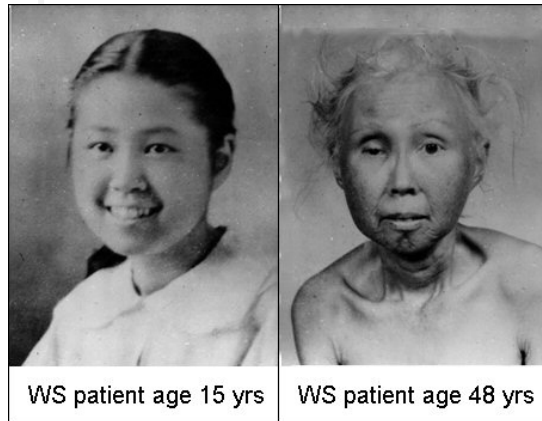
Descritta per la prima volta da Otto Werner nel 1904, è una malattia genetica autosomica recessiva.



SINDROME DI WERNER



SINDROME DI WERNER



Naso a
becco

Arti sottili

Bassa
statura

Tronco
tozzo

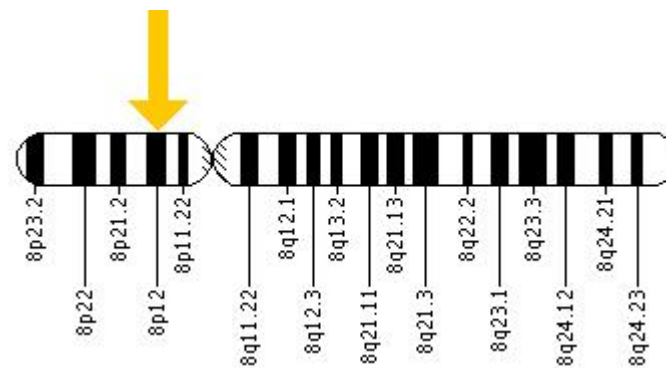
Il decesso solitamente sopraggiunge
intorno ai 40-50 anni

Non si conosce il motivo per cui il difetto genetico resta
silente nei primi dieci anni di vita



SINDROME DI WERNER

Sono stati identificati 60 tipi diversi di mutazioni tutte a carico del gene *Wrn* localizzato nel braccio corto del cromosoma 8 in posizione 12 (8p12)

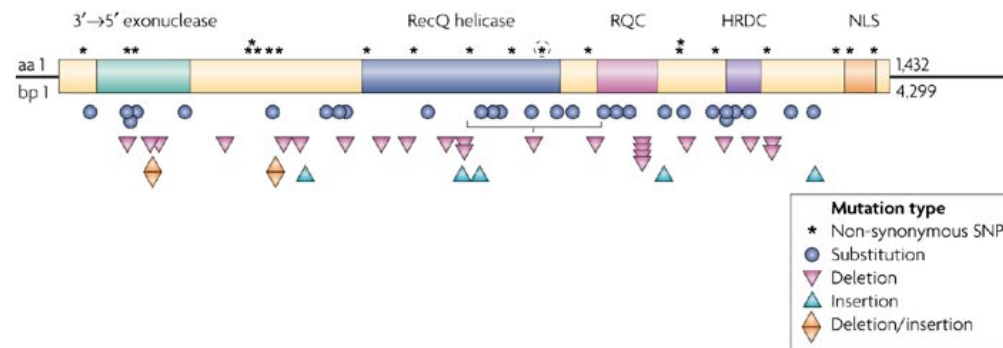


Review: Brian A. Kudlow et al 2007



SINDROME DI WERNER

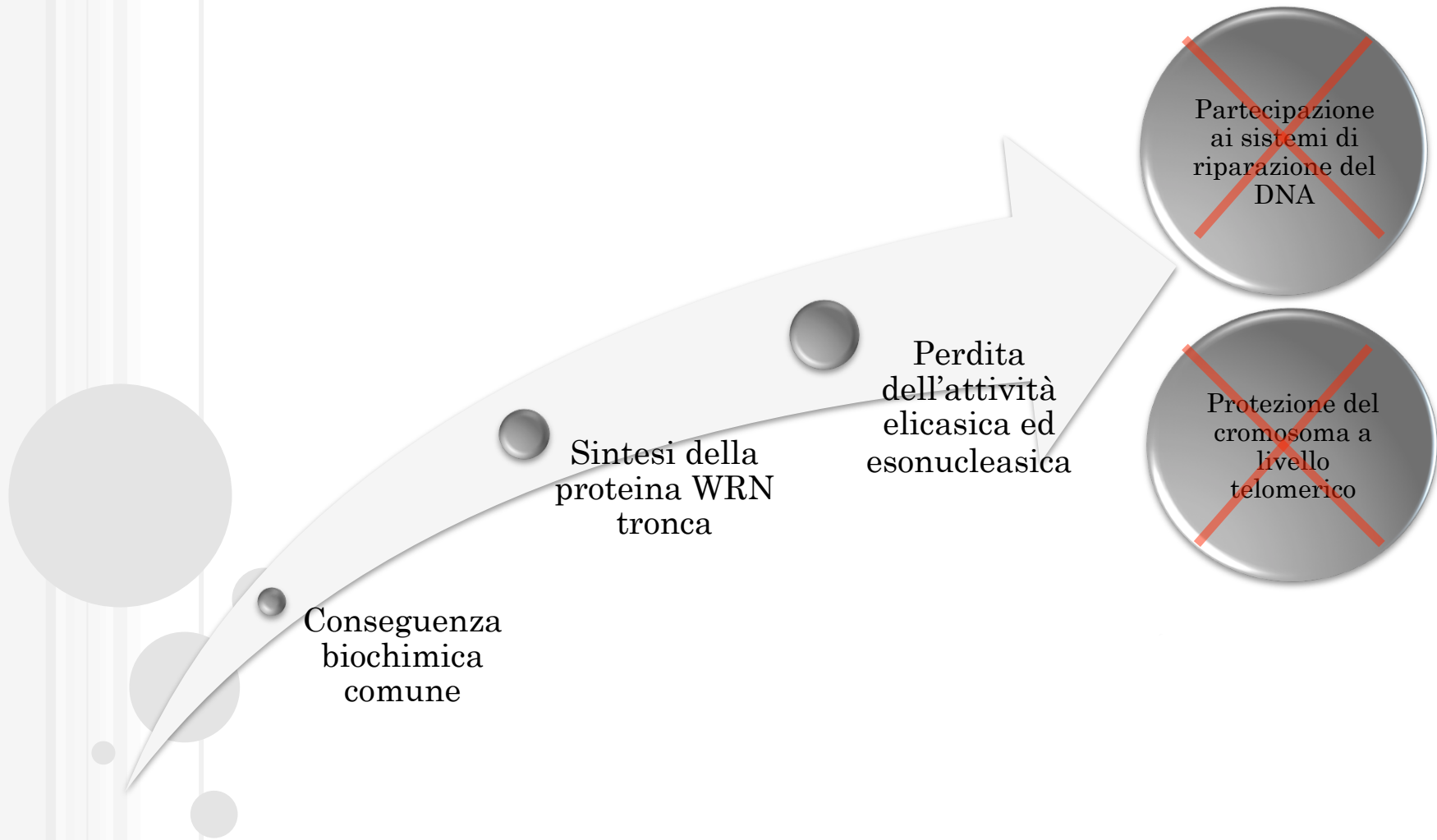
Il gene WRN è stato identificato nel 1996 e codifica per una proteina di 162 kDa chiamata WRN appartenente alla famiglia delle RecQ elicasi



Review: Brian A. Kudlow et al 2007



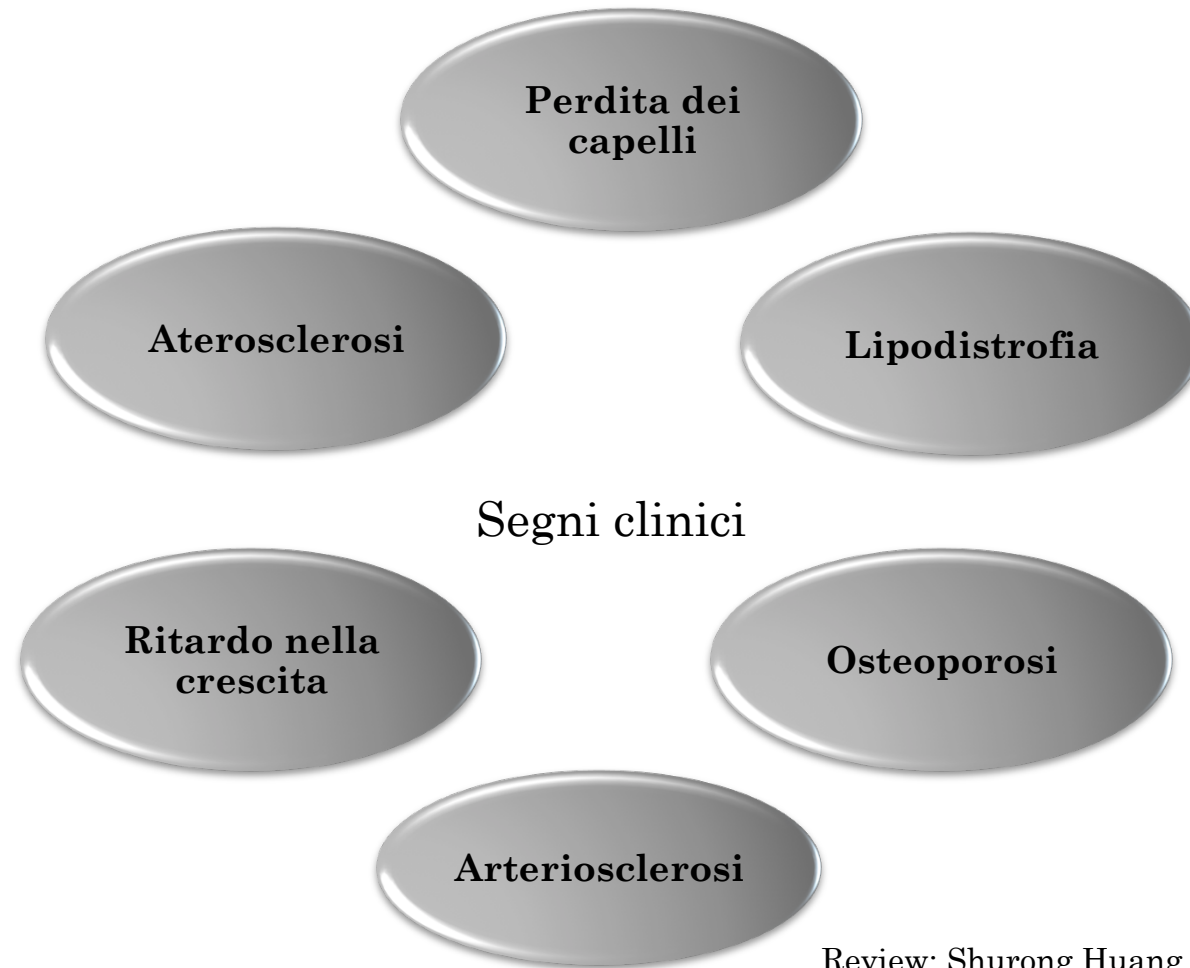
SINDROME DI WERNER



SINDROME DI HUTCHINSON-GILFORD

Descritta per la prima volta nel 1886 da Hutchinson e nel 1904 da Gilford, è una malattia genetica autosomica dominante

SINDROME DI HUTCHINSON-GILFORD



Review: Shurong Huang et al 2005



SINDROME DI HUTCHINSON-GILFORD

Naso a becco

Calvizie

Bassa statura



Testa più grande
in proporzione al
corpo

Tronco tozzo

Arti sottili

SINDROME DI HUTCHINSON-GILFORD

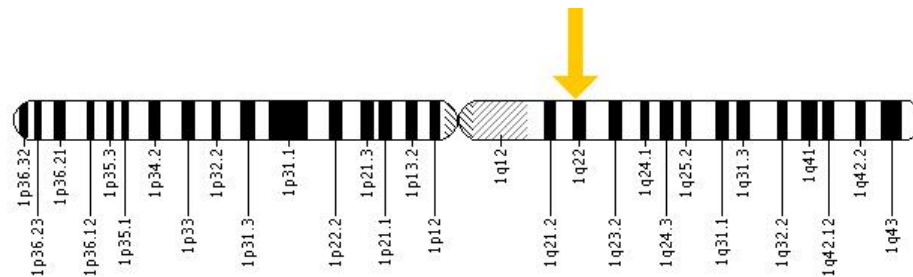
L'aspetto più serio della malattia, che rappresenta la causa di morte nel 90% dei casi è una progressiva aterosclerosi accompagnata dall'occlusione dei vasi principali, con morte per infarto del miocardio ad un'età media di circa 13 anni.



SINDROME DI HUTCHINSON-GILFORD

Le basi genetiche sono state scoperte nel 2003

La mutazione più comune è localizzata sul cromosoma 1 in posizione 22 (1p22) in corrispondenza del gene *Lmna*



SINDROME DI HUTCHINSON-GILFORD

Il gene LMNA codifica per una proteina molto importante, la lamina A, localizzata nella lamina nucleare, conferendole rigidità ed elasticità

Forma del nucleo

Trascrizione del DNA

Replicazione del DNA

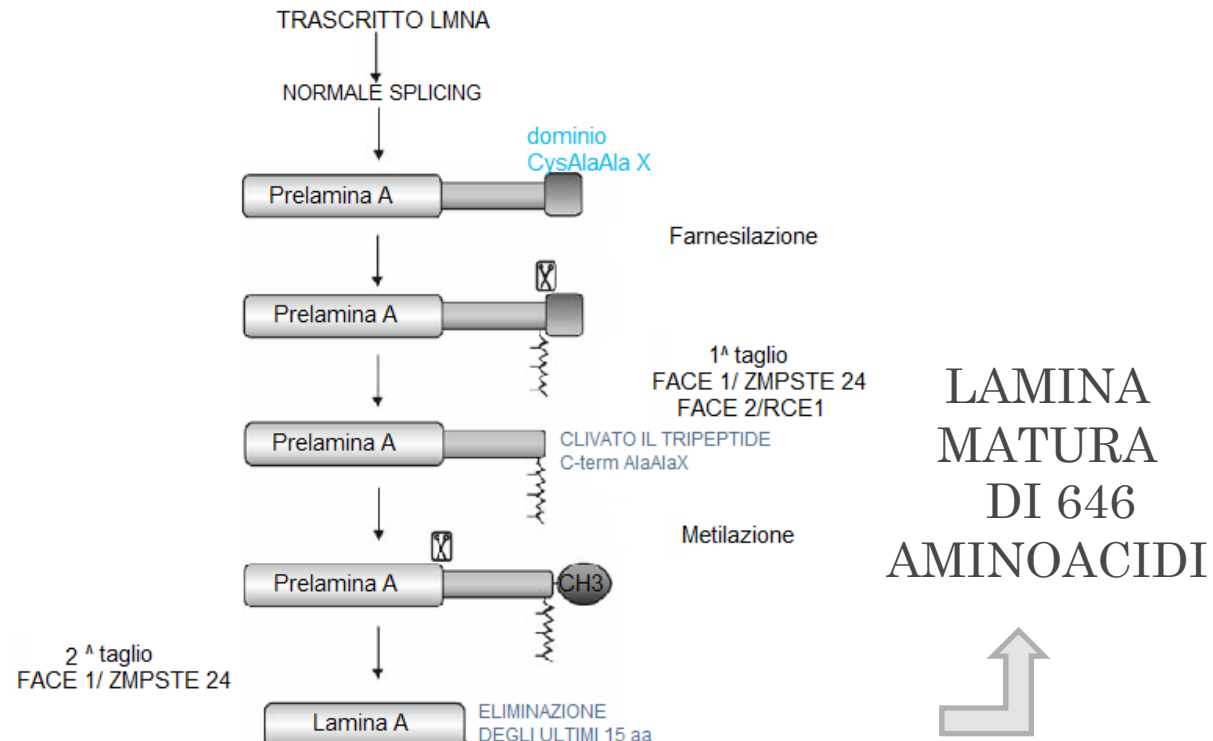
Divisione cellulare

Organizzazione della cromatina



SINDROME DI HUTCHINSON-GILFORD

LAMINA A → sintetizzata come una molecola precursore (prelamina A) che subisce poi 4 eventi di processamento post-traduzionale



SINDROME DI HUTCHINSON-GILFORD

HGPS

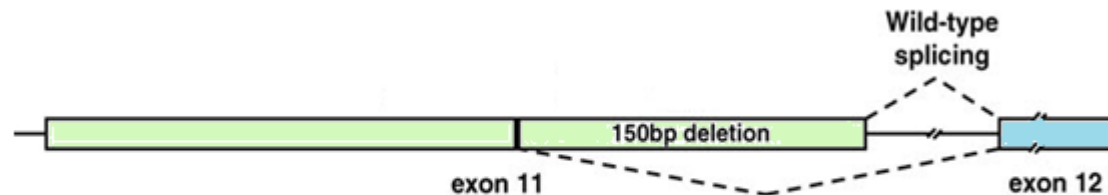
FORMA CLASSICA

Mutazione puntiforme eterozigote
LMNA c.1824C>T (p.Gly608Gly)

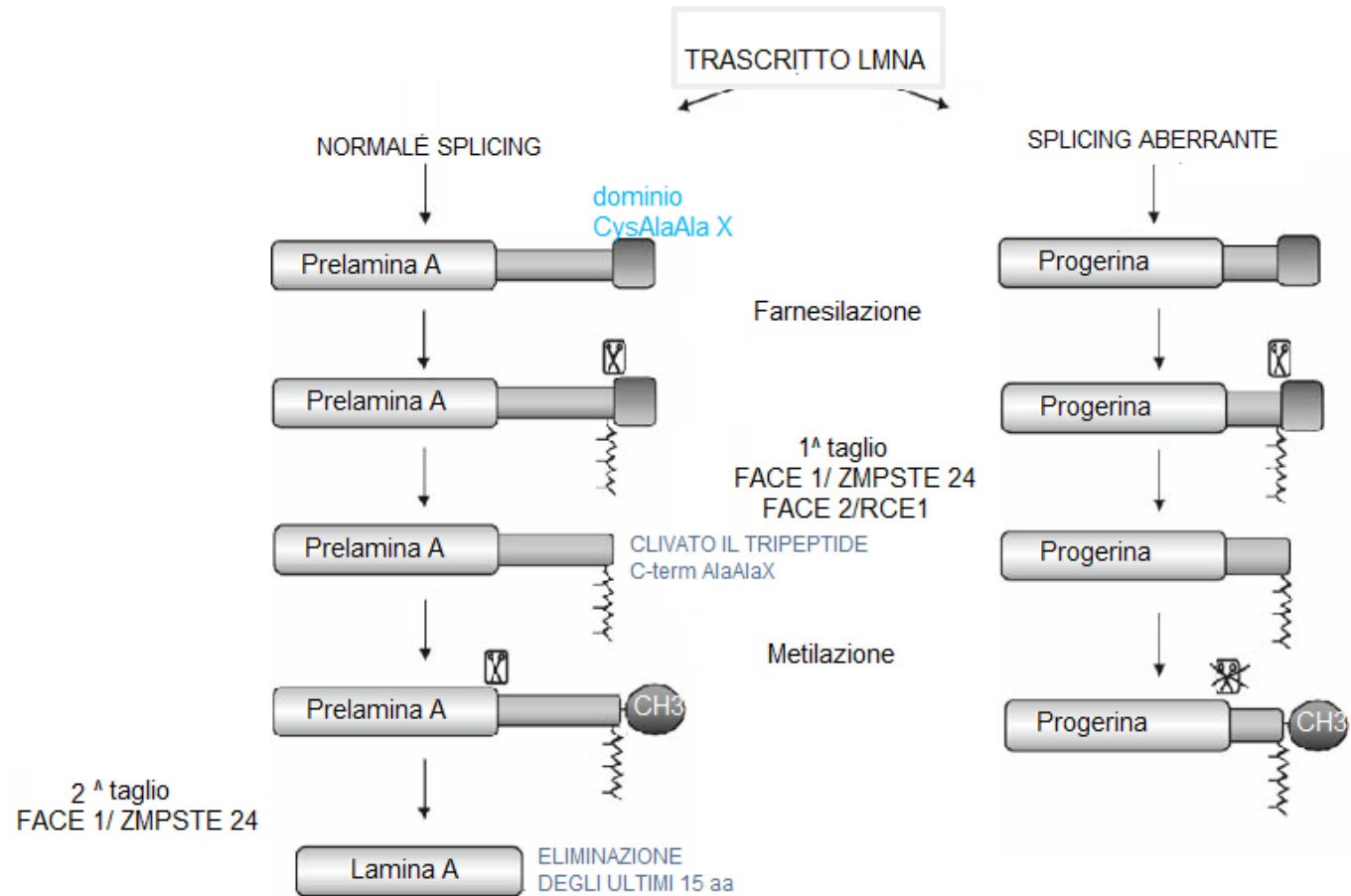
Formazione di un sito donatore di splicing
all'interno dell'esone 11 che porta alla
delezione di 150 nucleotidi e 50 aa dalla
lamina A (compreso il sito di
riconoscimento di ZMPSTE24)

FORMA ATIPICA

Una delle 3 mutazioni
eterozigote LMNA :
c.1822 G>A (p.Gly608Ser),
c.1821 G>A (p.Val607Val),
c.1968+1G>A



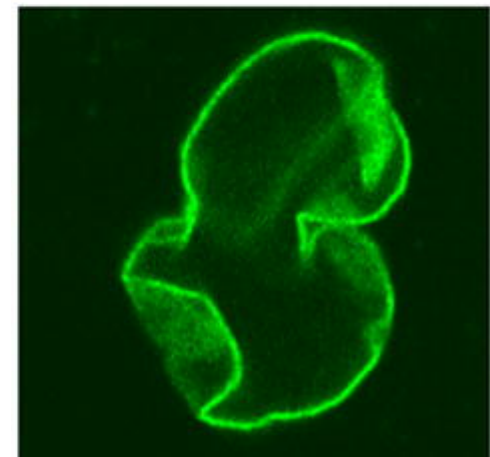
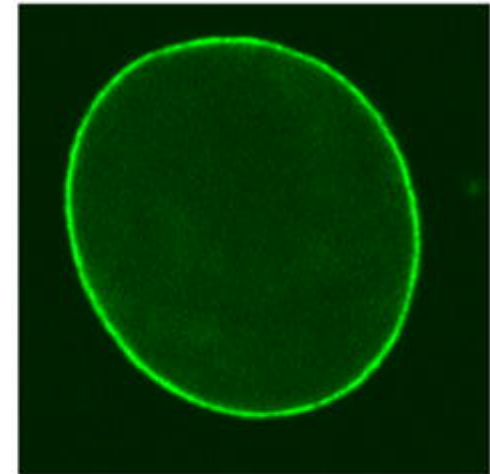
SINDROME DI HUTCHINSON-GILFORD



SINDROME DI HUTCHINSON-GILFORD

La progerina manca del secondo sito di clivaggio e si accumula alla periferia del nucleo nella forma farnesilata.

L'associazione con la membrana nucleare porta ad un'alterazione della morfologia tipica di questa malattia.



STRATEGIE TERAPEUTICHE

LMNA transcript

Aberrant
splicing

Progerin mRNA

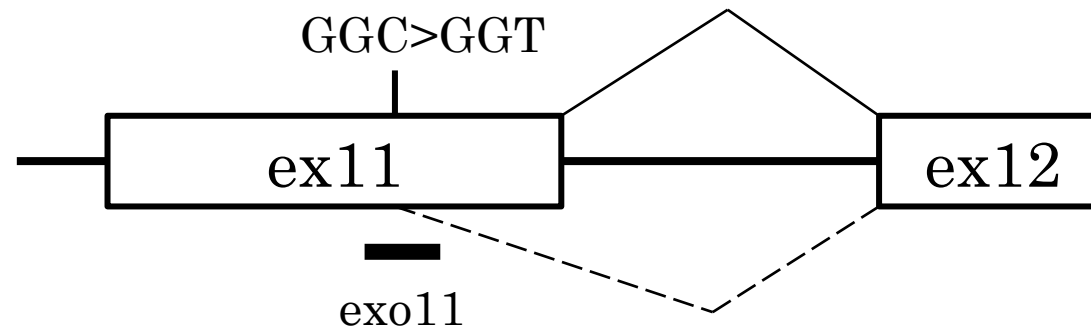


Unprenylated
progerin



Prenylated
progerin

OLIGONUCLEOTIDE ANTISENNO PER MASCHERARE IL SITO DI SPLICING ABERRANTE NEL GENE LMNA MUTATO

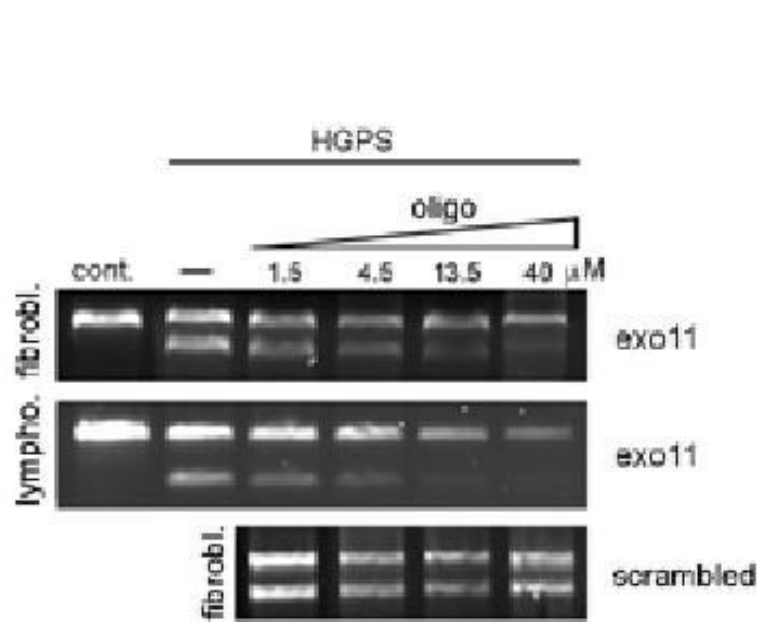


Exo11 è un oligonucleotide morpholino che appaiandosi sull'esone 11 in corrispondenza della mutazione HPGS, previene l'accesso dell'apparato di splicing sul sito di splicing aberrante

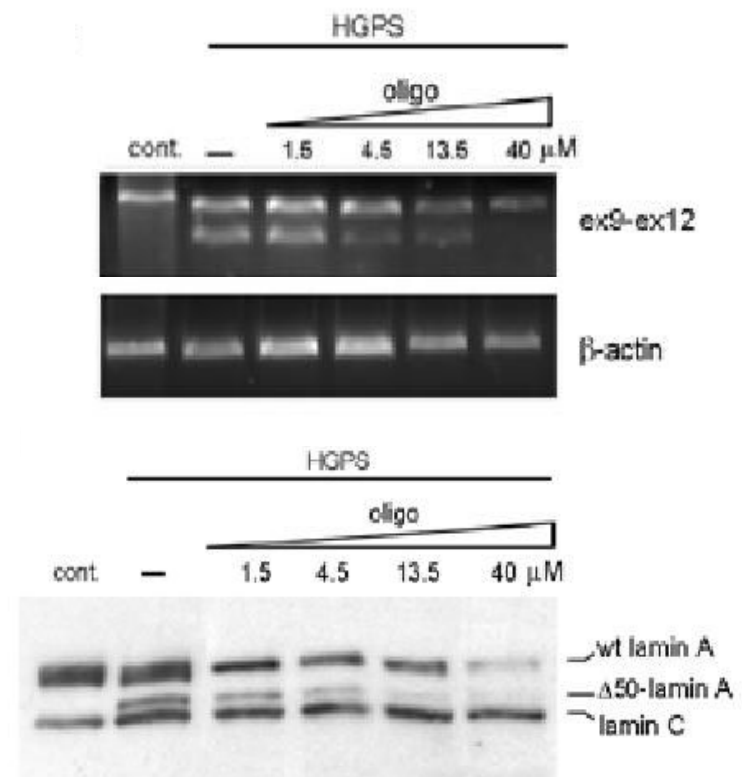
Scaffidi *et al.* 2005



Exo11 è stato introdotto in fibroblasti HGPS per elettroporazione:

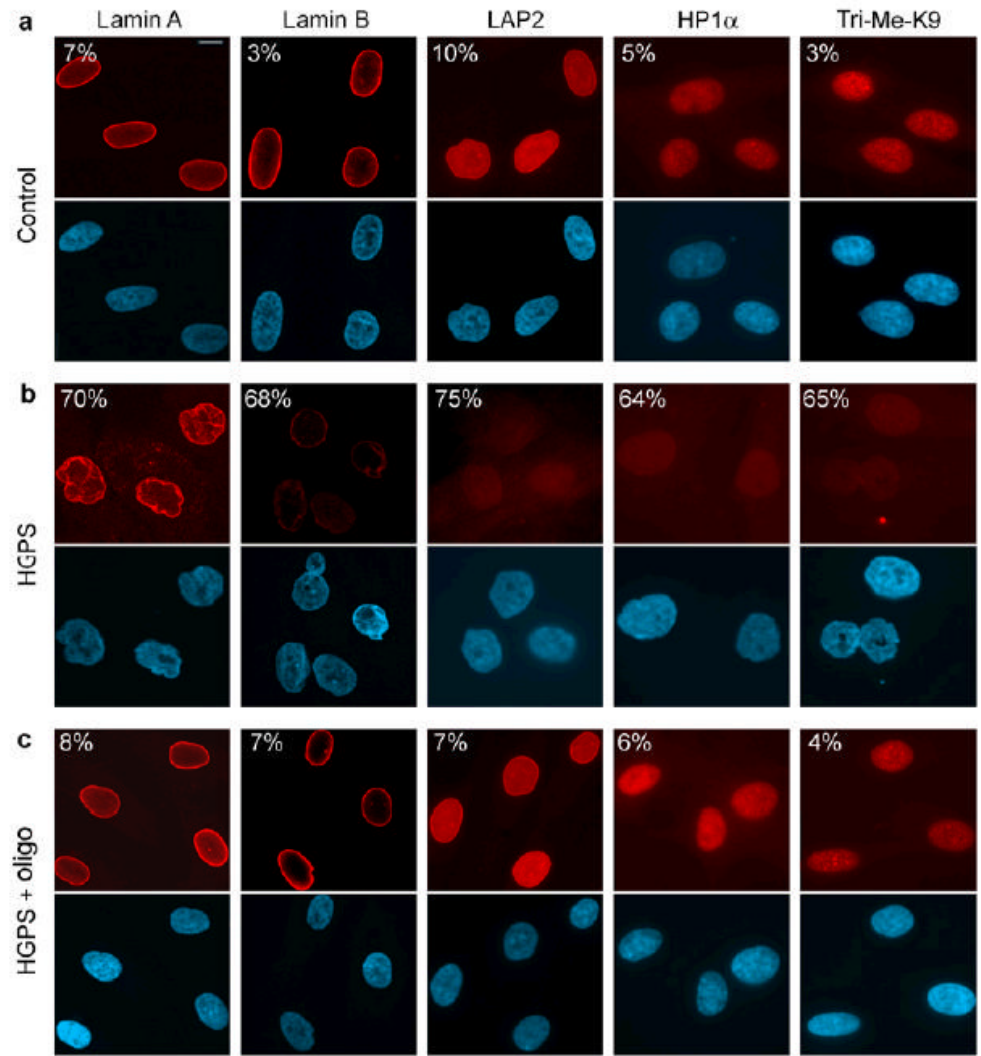


Exo11 blocca lo splicing aberrante dell'mRNA della lamina A: la produzione dell'mRNA delecto viene ridotta del 90%



I livelli della lamina A mutata scendono al 5%

Fibroblasti HGPS trattati con l'oligonucleotide exo11 recuperano il fenotipo wt



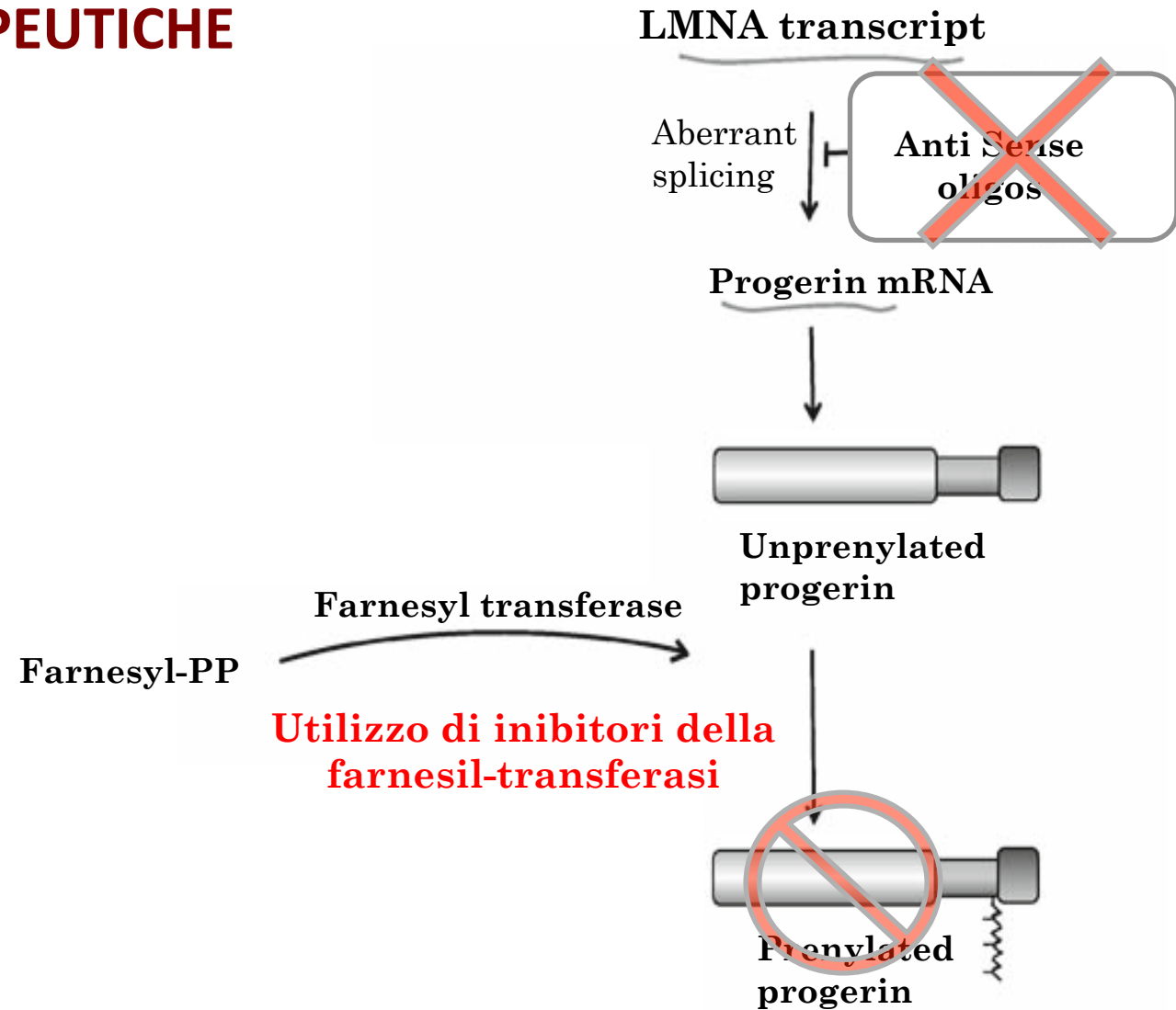
È STATO DIMOSTRATO CHE:

- LA PROGERINA HA UN EFFETTO NEGATIVO DOMINANTE SUL FENOTIPO CELLULARE
- L' ELIMINAZIONE DELLA FORMA MUTANTE DELLA LAMINA A È NECESSARIA E SUFFICIENTE A RECUPERARE IL NORMALE FENOTIPO CELLULARE NEI FIBROBLASTI HGPS



**UNA STRATEGIA TERAPEUTICA BASATA
SULLA CORREZIONE DELLO SPLICING ABERRANTE
SEMBRA ESSERE PROMETTENTE**

STRATEGIE TERAPEUTICHE



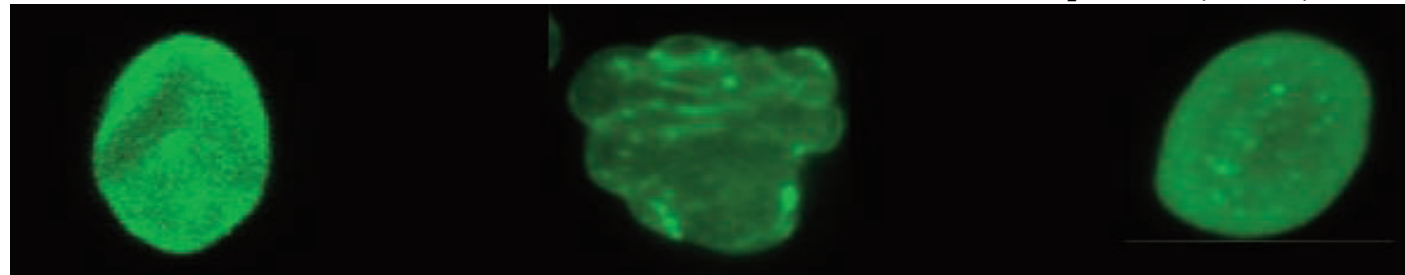
Vari studi hanno evidenziato miglioramenti in cellule prelevate da pazienti malati o da topi progerici e **trattate con FTIs.**



*Glynn and Glover 2005;
Mallampalli et al. 2005;
Yang et al. 2005;
Toth et al. 2005;
Capell et al. 2005.*

Capacità di ripristinare la normale morfologia dei nuclei in cellule HGPS:

Capell et al., PNAS, 2005

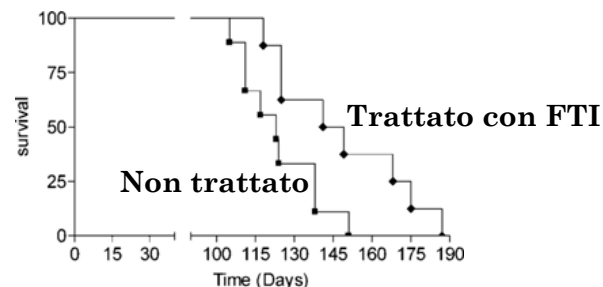


Normal Skin Cell

Progeria Skin Cell

Progeria Skin Cell
Treated with FTI

Trattamento di topi *Zmpste24*^{-/-} con FTIs:



(Fong et al. 2006)



FIRST-EVER PROGERIA CLINICAL DRUG TRIAL

28 bambini

2007-2010 → Risultati non ancora pubblicati

Fase II

Trattamento:

somministrazione orale due volte
al giorno di Lofarnib (un FTI)
per due anni



LMNA transcript

Aberrant splicing

~~Anti Sense oligos~~

Progerin mRNA



Unprenylated progerin



Prenyated progerin

Ulteriori studi hanno però evidenziato una riduzione solo marginale del processamento della prelamina A

FTI

Farnesyl transferase

Farnesyl-PP

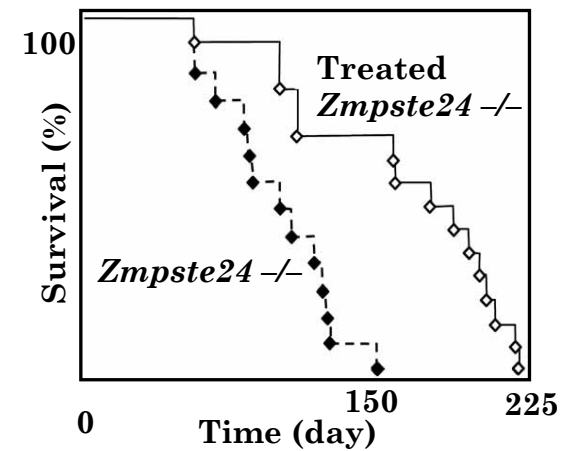
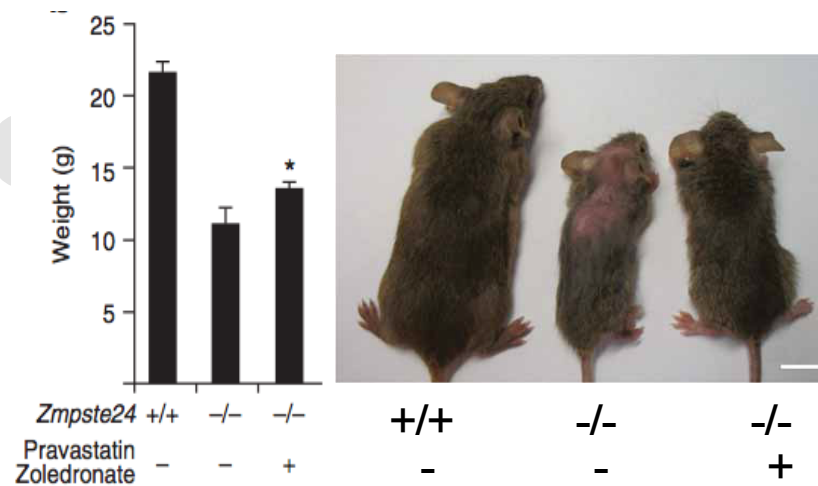
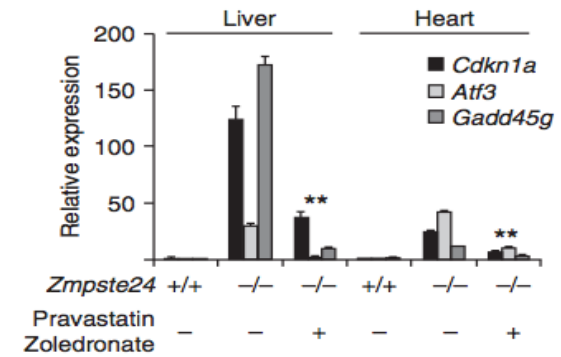
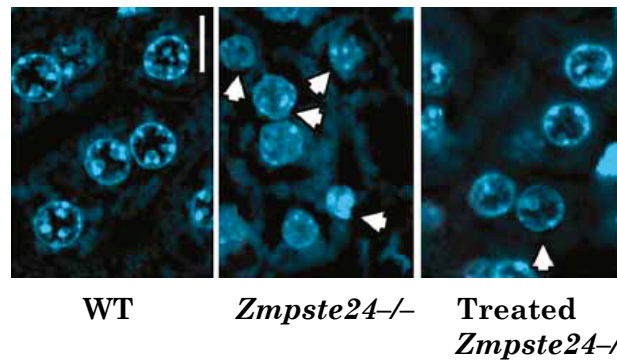
Ciò può essere spiegato dall'azione alternativa della geranilgeranil-trasferasi in presenza di FTI



Nat Med. 2008 Jul;14(7):767-72. Epub 2008 Jun 29.

Combined treatment with statins and amino-bisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging.

Varela I et al.



TRIPLE DRUG CLINICAL TRIAL

Medications that Inhibit the Farnesylation of Progerin

Trattamento:

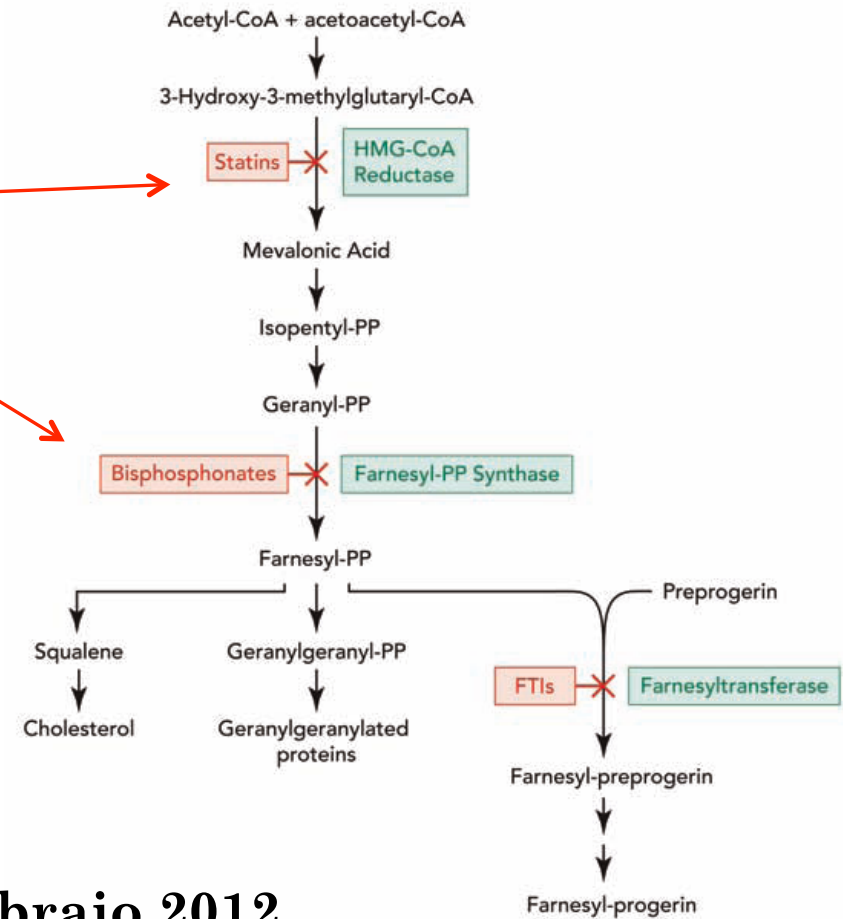
- Lonafarnib (FTI)
- + Pravastatin
- + Zoledronic Acid



45 pazienti

Fase II

Agosto 2009 – Febbraio 2012



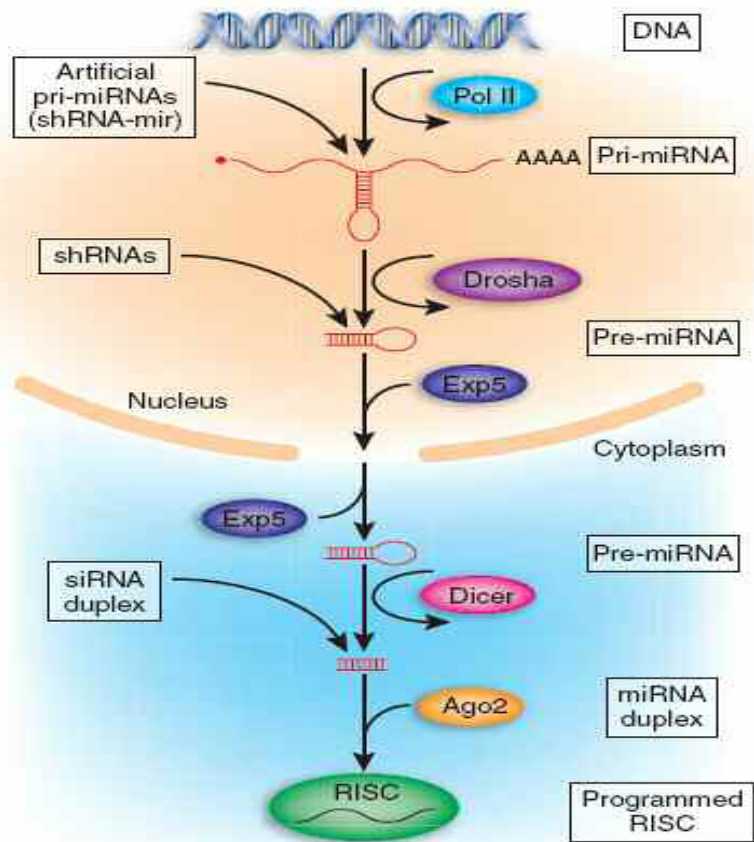
STRATEGIA DI TERAPIA GENICA

OBIETTIVO:

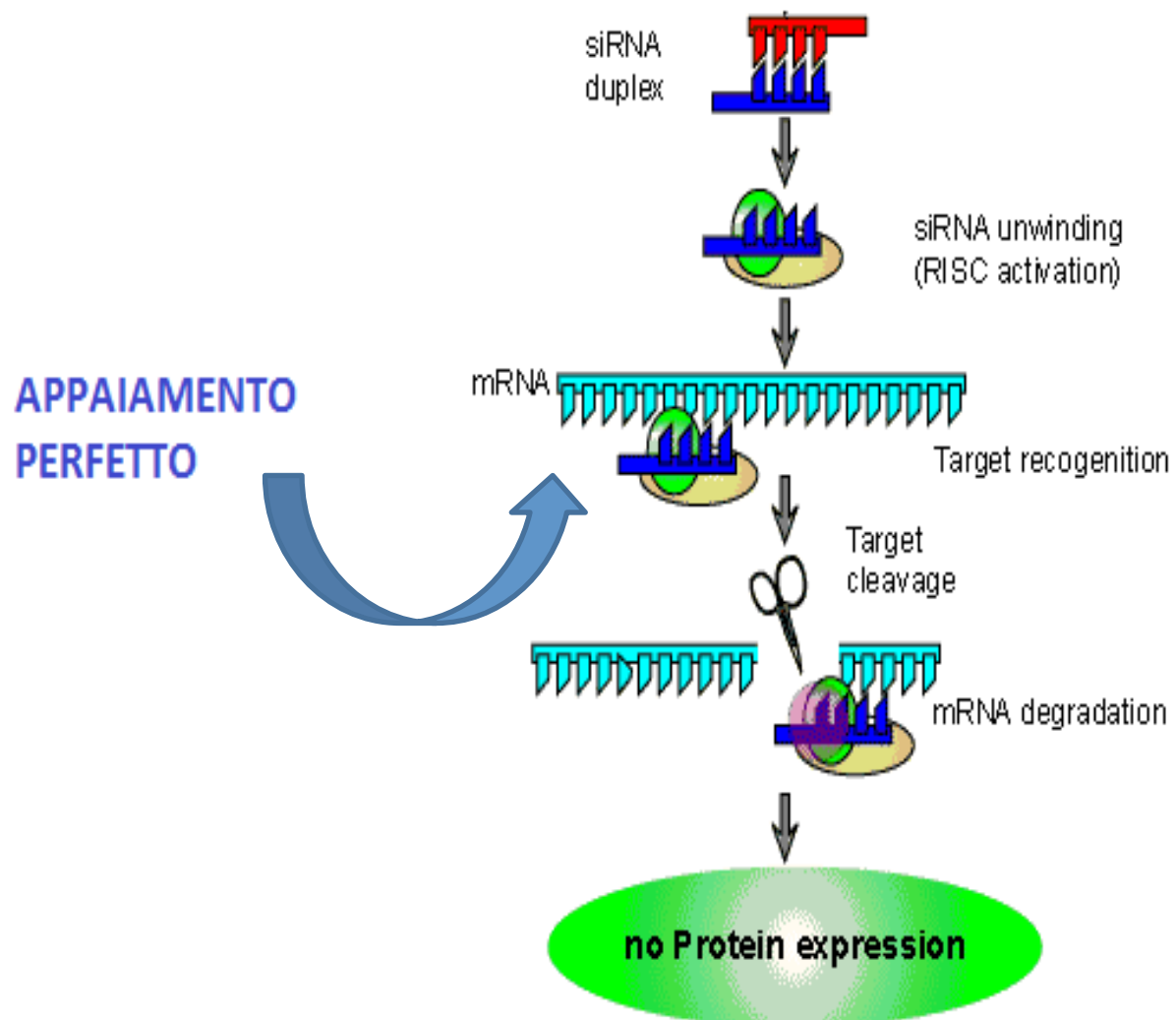
IMPEDIRE LA PRODUZIONE DELLA PROGERINA
A E INCREMENTARE LA LAMINA A ATTRAVERSO
L'USO DI UN shRNA E UNA SEQUENZA
ANTISENSEN

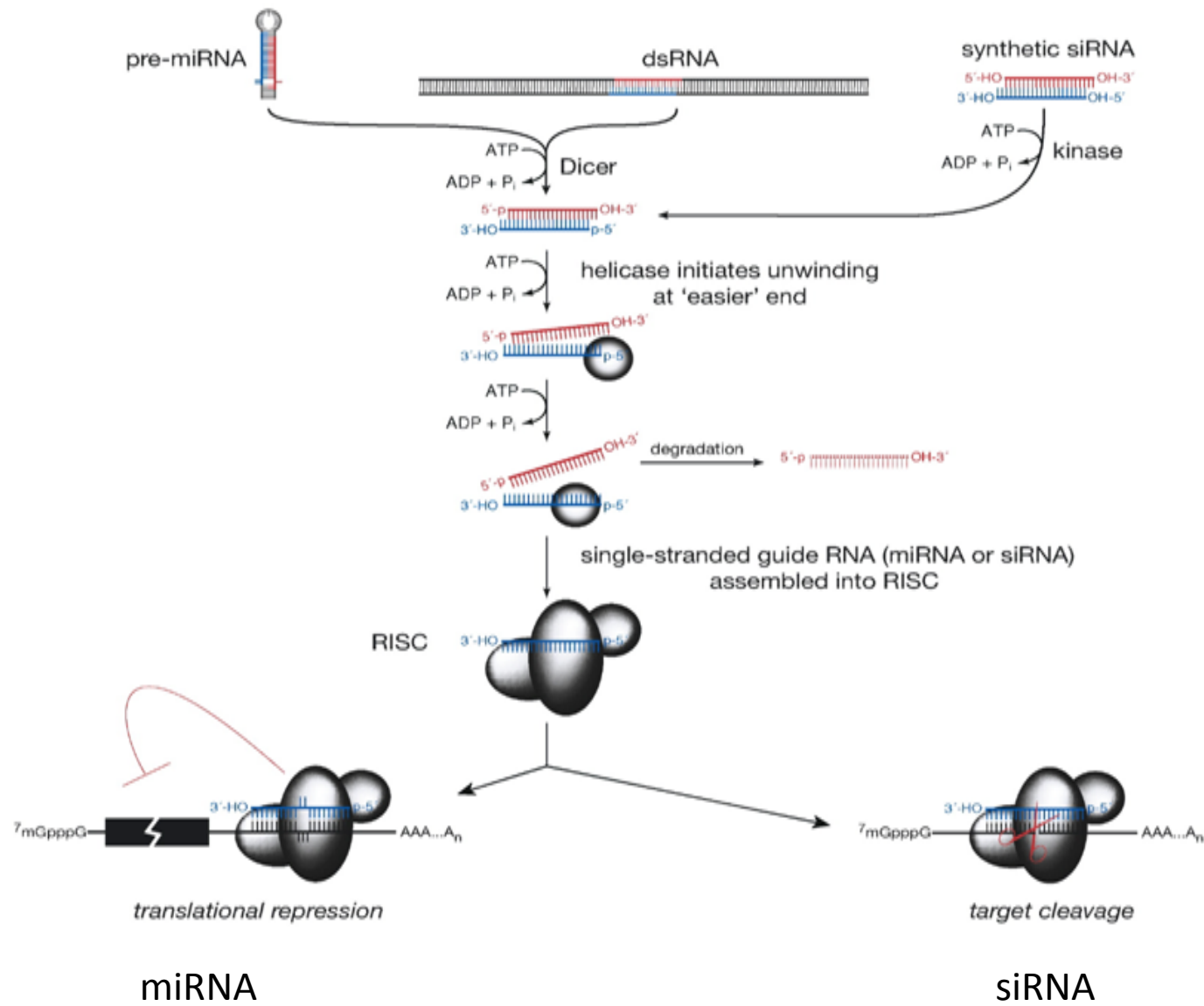


shRNA

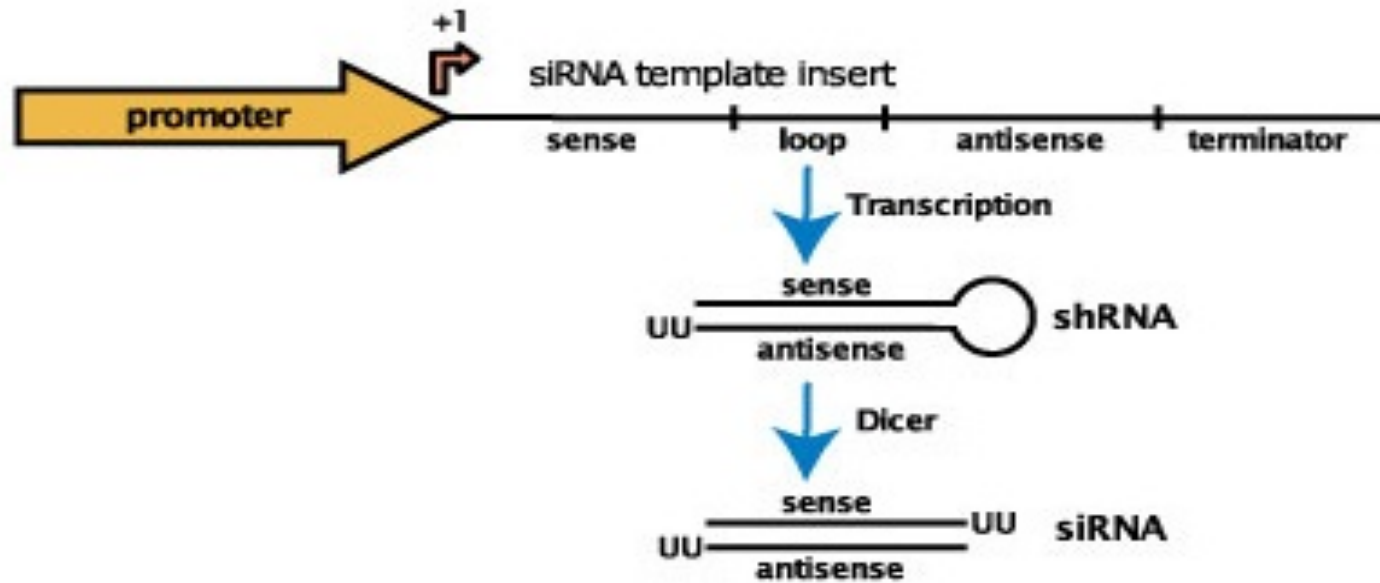


Ognuno dei tre intermedi a RNA, pri-miRNA, pre-miRNA e miRNA, può rappresentare un punto di entrata di RNA sintetici per indurre l'RNAi e regolare l'espressione genica in cellule eucariotiche



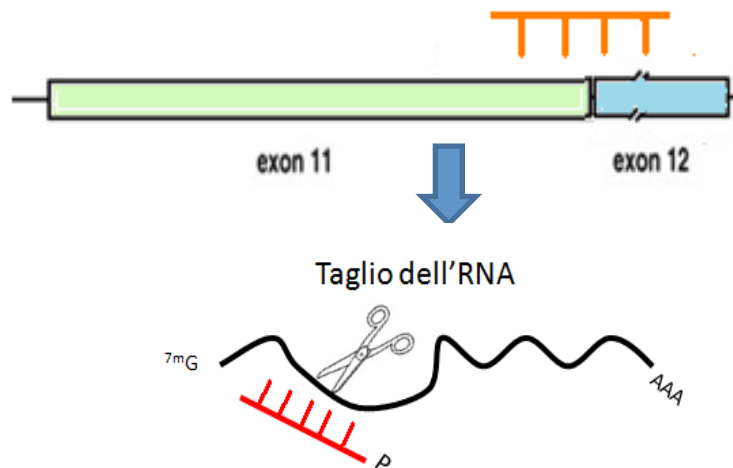


COME PRODURRE Lo shRNA?

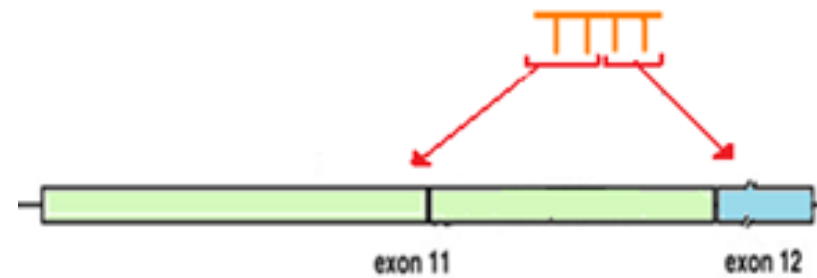


STRATEGIA DI TERAPIA GENICA

RNA INTERFERENCE DIRETTO SULLA GIUNZIONE
ESONE11 - ESONE 12 DELLA PROGERINA



mRNA PROGERINA

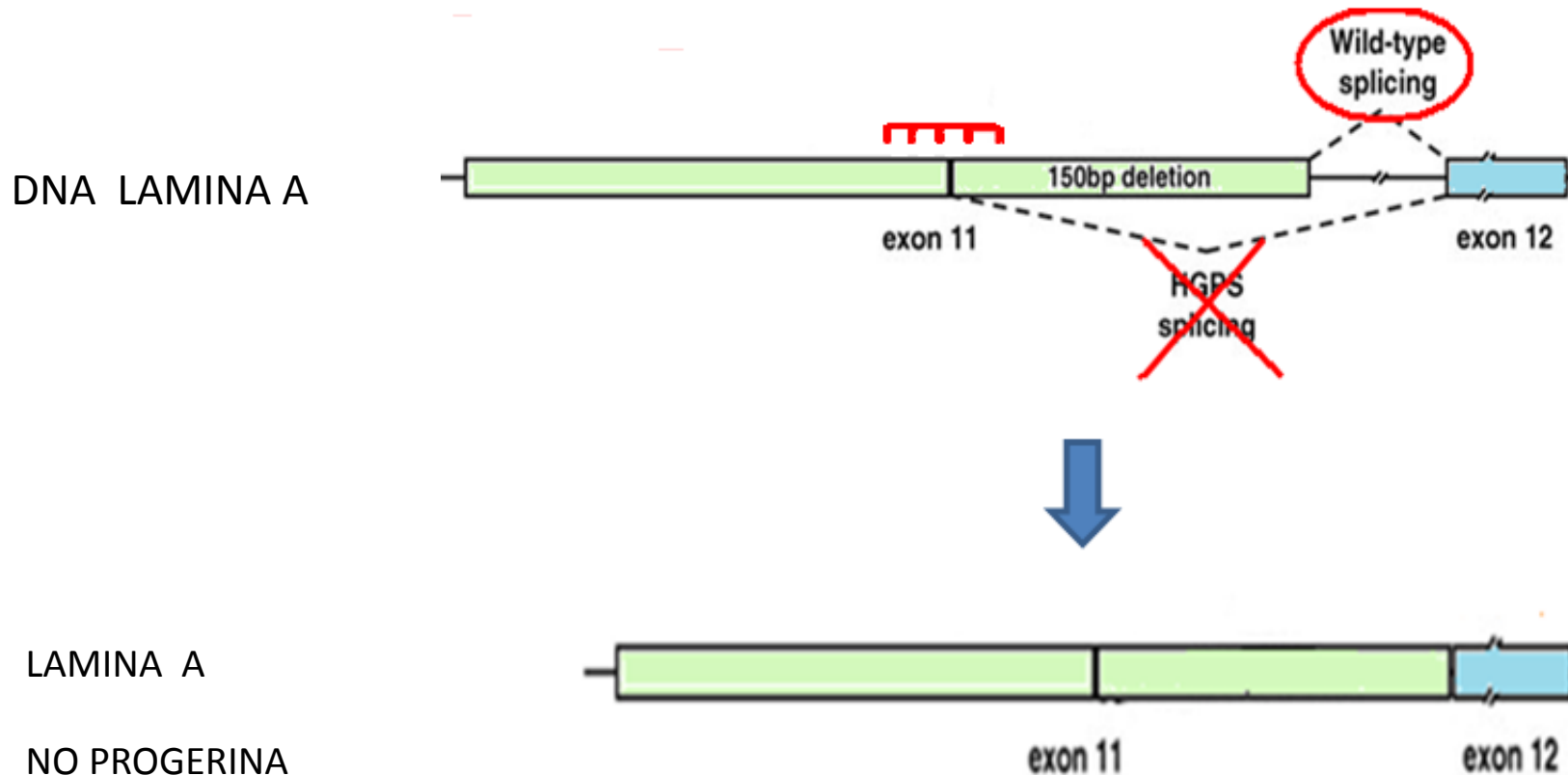


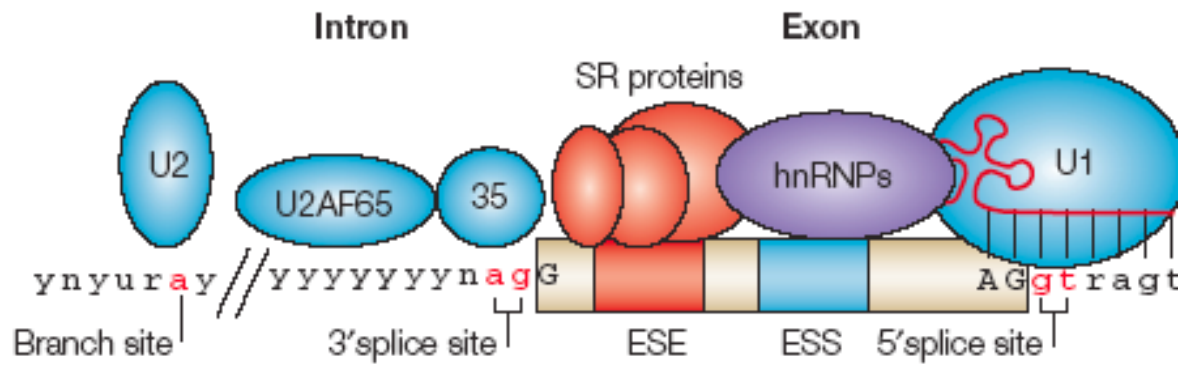
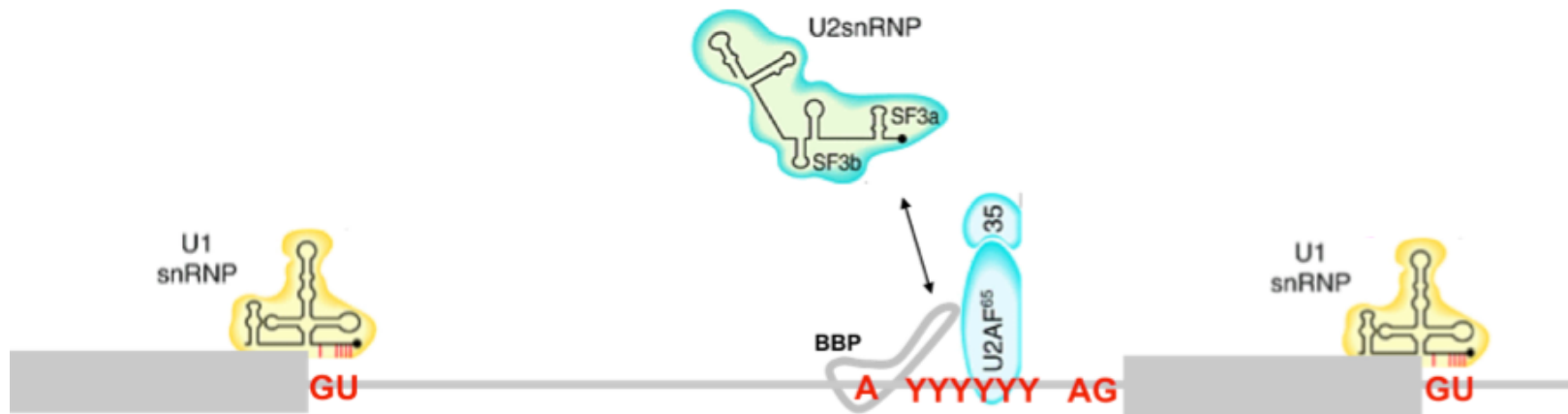
mRNA LAMINA A

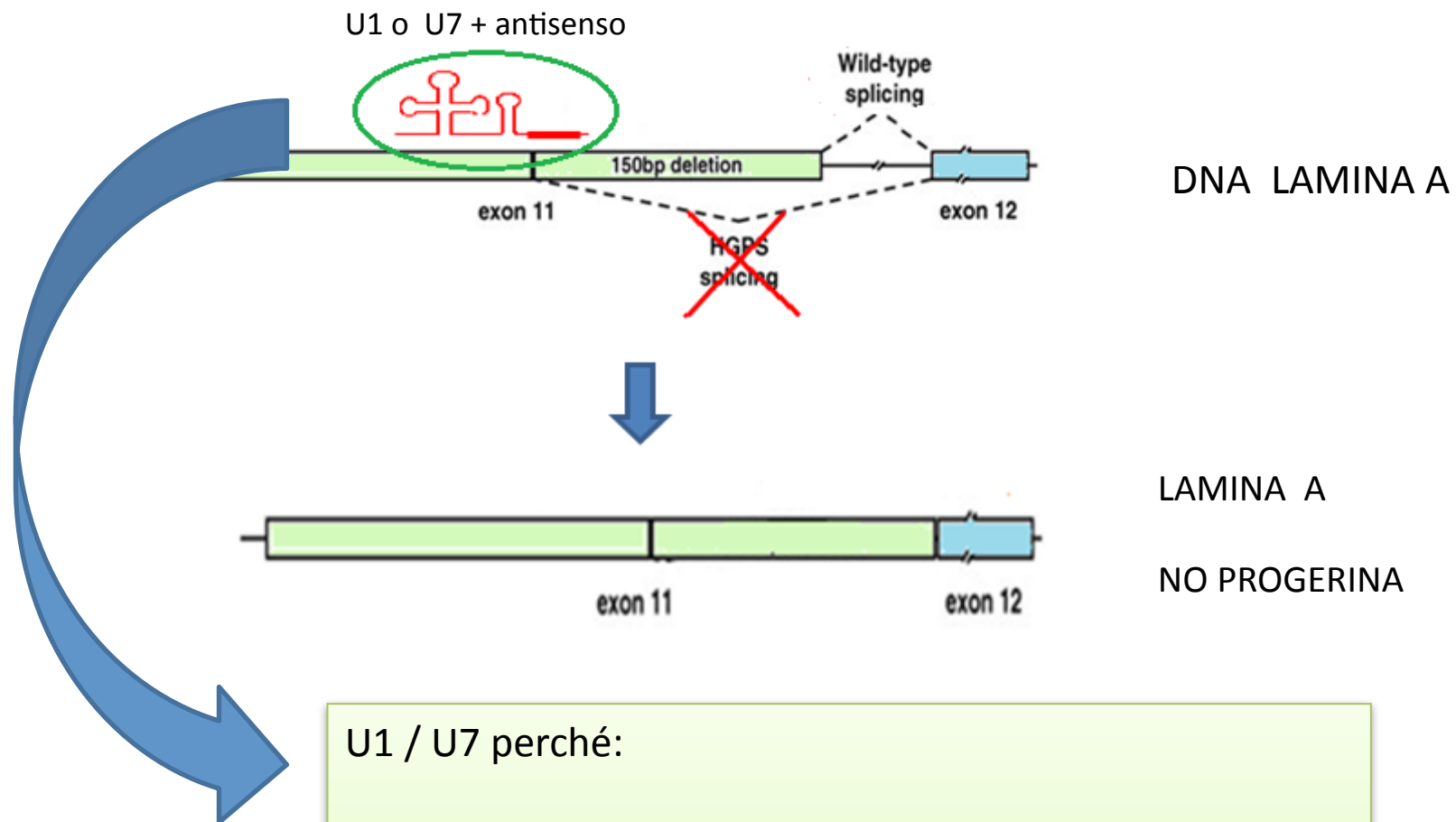
SEQUENZA ANTISENSO



Mascheramento del sito donatore di splicing che si forma all'interno dell'esone 11

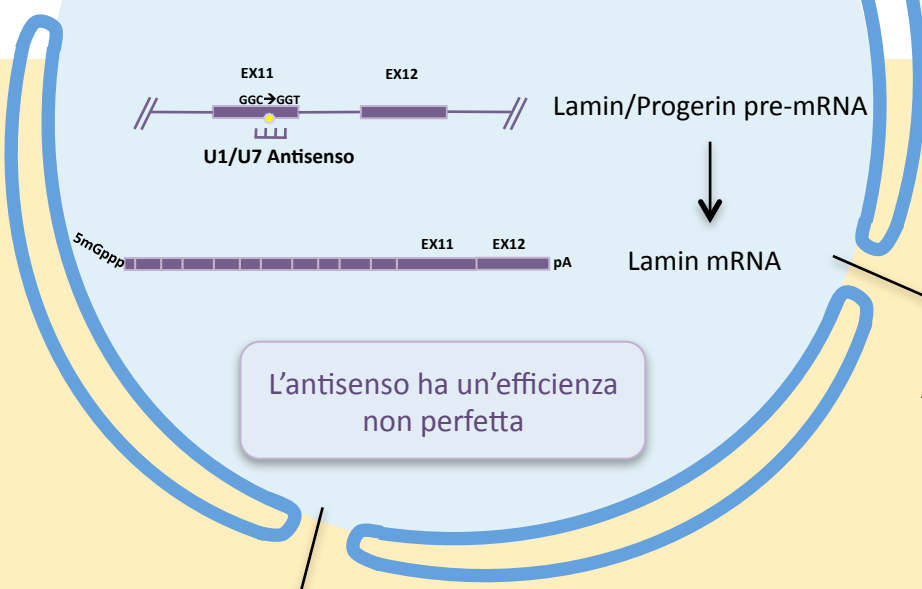






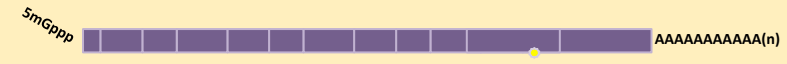
U1 / U7 perché:

- STABILIZZA LA SEQUENZA ANTISENSENTO
- CONSENTE LA LOCALIZZAZIONE NUCLEARE (U1 SOPRATTUTTO NELLO SPLICEASOMA)
- PERMETTE L'ESPRESSIONE CONTINUA DELL'ANTISENSENTO

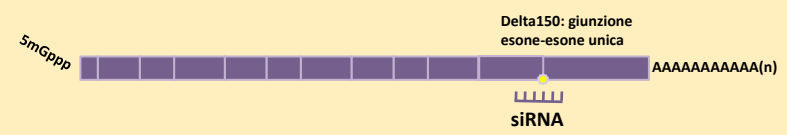


L'antisenso ha un'efficienza non perfetta

Lamin mRNA



Progerin mRNA



Silenziamento RISC - dipendente

L'efficienza dei due processi è in teoria combinatoria:
 $1 - (1 - \text{eff}_a)(1 - \text{eff}_b)$

FASE DI RICERCA PRECLINICA (IN VITRO)

A) SCELTA DEL SISTEMA CELLULARE USATO COME MODELLO DELLA MALATTIA

B) IDENTIFICAZIONE DI STANDARD DA UTILIZZARE COME FENOTIPO MOLECOLARE

C) SCELTA DEL VETTORE DI TRASDUZIONE DELLE MOLECOLE TERAPEUTICHE (ANTISENSENNO + siRNA)



FASE DI RICERCA PRECLINICA (IN VITRO)

A) SCELTA DEL SISTEMA CELLULARE USATO COME MODELLO DELLA MALATTIA

Il modello deve avere il genotipo del target della terapia genica (C1824T / Gly608Gly)



Progeria Research Foundation
Cell and Tissue Bank
Leslie B Gordon, PhD

Il modello deve ricapitolare le caratteristiche cellulari del target scelto per la terapia genica



Cellule Muscolari Lisce (VSMCs)

Il modello deve essere disponibile in quantità sufficienti e facilmente utilizzabile in coltura



Espianti primari di VSMCs?

FASE DI RICERCA PRECLINICA (IN VITRO)

A) SCELTA DEL SISTEMA CELLULARE USATO COME MODELLO DELLA MALATTIA

Il modello deve essere disponibile in quantità sufficienti e facilmente utilizzabile in coltura



Espianti primari di VSMCs?



iPSCs da fibroblasti HPGS indotte a differenziare in cellule del tessuto muscolare liscio vascolare

LETTER

doi:10.1038/nature09879

Recapitulation of premature ageing with iPSCs from Hutchinson–Gilford progeria syndrome

Guang-Hui Liu¹, Basam Z. Barkho¹, Sergio Ruiz¹, Dinh Diep², Jing Qu¹, Sheng-Lian Yang¹, Athanasia D. Panopoulos¹, Keiichiro Suzuki¹, Leo Kurian¹, Christopher Walsh¹, James Thompson³, Stephanie Boue⁴, Ho Lim Fung², Ignacio Sancho-Martinez¹, Kun Zhang², John Yates III³ & Juan Carlos Izpisua Belmonte^{1,4}

Cell Stem Cell

Volume 8, Issue 1, 7 January 2011, Pages 31-45

doi:10.1016/j.stem.2010.12.002 | How to Cite or Link Using DOI

Copyright © 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Permissions & Reprints

Article

A Human iPSC Model of Hutchinson Gilford Progeria Reveals Vascular Smooth Muscle and Mesenchymal Stem Cell Defects

Jinqiu Zhang¹, Qizhou Lian^{3,4}, Guili Zhu¹, Fan Zhou¹, Lin Sui¹, Cindy Tan¹, Rafidah Abdul Mutalif², Raju

Navasankari², Yuelin Zhang³, Hung-Fat Tse³, Colin L. Stewart² and Alan Colman¹



FASE DI RICERCA PRECLINICA (IN VITRO)

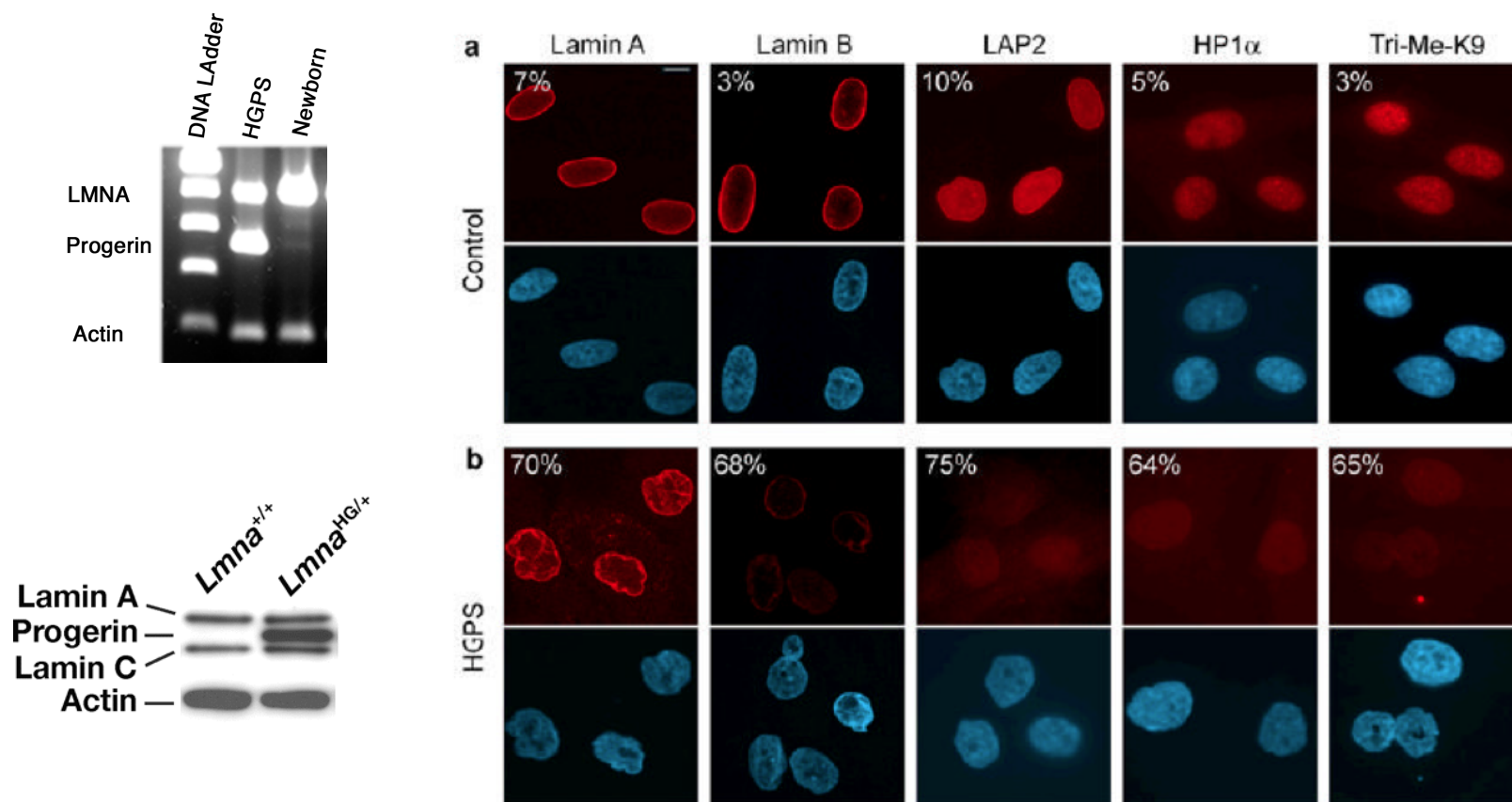
B) IDENTIFICAZIONE DI STANDARD DA UTILIZZARE COME FENOTIPO MOLECOLARE

- Espressione dell'mRNA di Progerina
- Espressione di Progerina
- Nuclei dismorfici
- Delocalizzazione di Lamina B e LAPs
- Downregolazione di HP1alpha
- Perdita di eterocromatinizzazione



FASE DI RICERCA PRECLINICA (IN VITRO)

B) IDENTIFICAZIONE DI STANDARD DA UTILIZZARE COME FENOTIPO MOLECOLARE

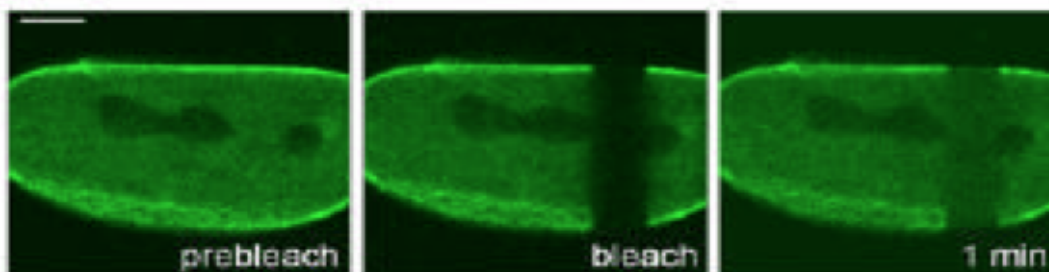


FASE DI RICERCA PRECLINICA (IN VITRO)

B) IDENTIFICAZIONE DI STANDARD DA UTILIZZARE COME FENOTIPO MOLECOLARE

FRAP Assay: Fluorescence Recovery After Photobleaching

- Lamina A taggata con GFP viene fatta esprimere in cellule sane, HGPS e trattate
- Una striscia sottile di nucleo viene sottoposta a “photobleaching”
- La fluorescenza viene rilevata prima e dopo il bleaching

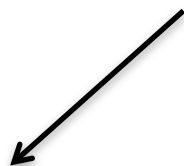


La cinetica del recupero di fluorescenza nella zona “bleached” è diversa in cellule WT e HGPS

FASE DI RICERCA PRECLINICA (IN VITRO)

C) SCELTA DEL VETTORE DI TRASDUZIONE DELLE MOLECOLE TERAPEUTICHE (ANTISENSO + SIRNA)

Il sistema più efficiente per l'espressione eterologa a fini di ricerca è rappresentato dai vettori lentivirali



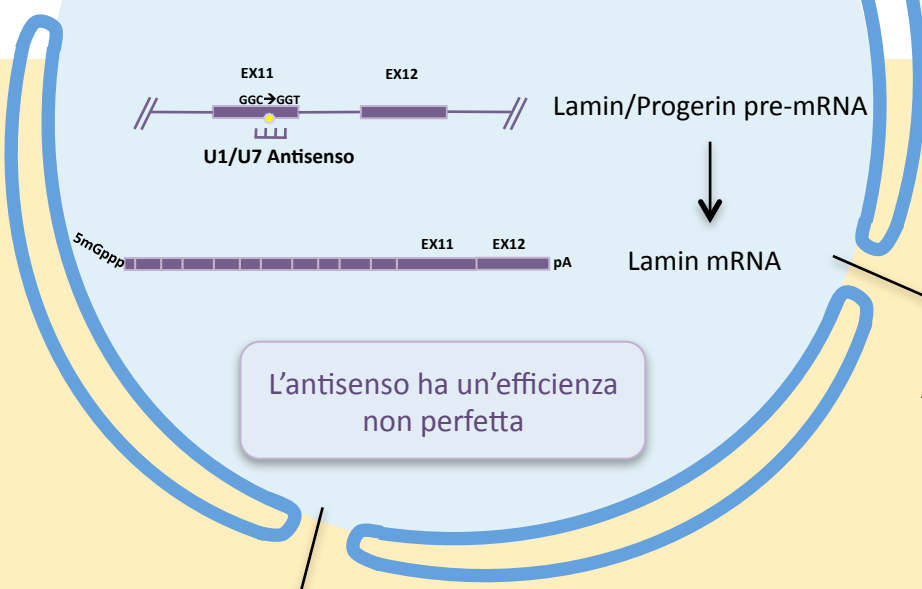
Semplici da reperire e da usare



In grado di infettare qualunque tipo cellulare

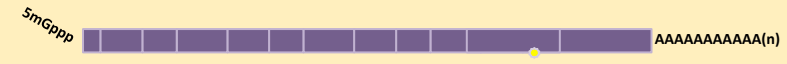


Efficienza di espressione del transgene altissima

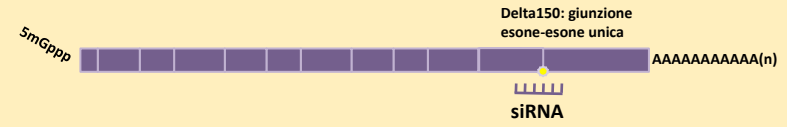


L'antisenso ha un'efficienza non perfetta

Lamin mRNA



Progerin mRNA



Silenziamento RISC - dipendente

L'efficienza dei due processi è in teoria combinatoria:
 $1 - (1 - \text{eff}_a)(1 - \text{eff}_b)$

MA... bisogna verificarlo!

FASE DI RICERCA PRECLINICA (IN VITRO)

DISEGNO SPERIMENTALE

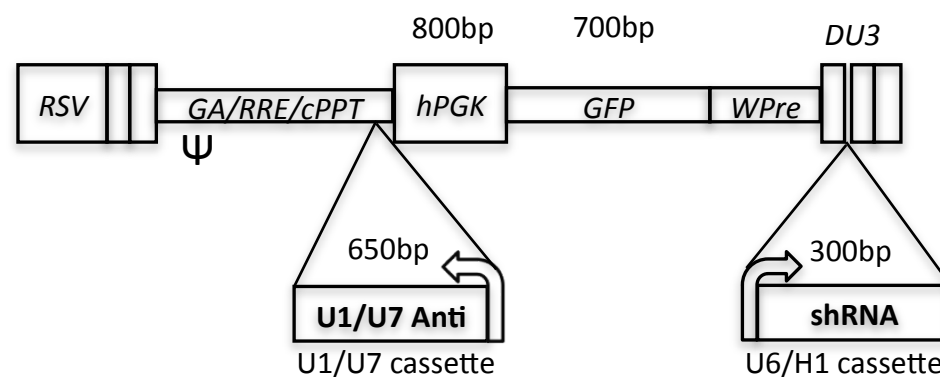
1. Produzione di 3 vettori di trasduzione
2. Verifica dell'espressione dei costrutti in HeLa
3. Produzione dei lentivettori in 293T
4. Infezione di VSMCs differenziate da iPSCs WT e HGPS

FASE DI RICERCA PRECLINICA (IN VITRO)

DISEGNO SPERIMENTALE

1. Produzione di 3 vettori di trasduzione

2. Verifica dell'espressione dei costrutti in HeLa



- U1, U7 e H1 sono PolII
- U6 è PolIII
- Tuttavia U7 e U6 hanno consensus simili

Le combinazioni migliori sono U1 con U6 o U7 con H1

FASE DI RICERCA PRECLINICA (IN VITRO)

DISEGNO SPERIMENTALE

Come scegliere le
sequenze dell'antisenso
e dell'siRNA?



Subject Category: Oligonucleotide Therapy

Molecular Therapy (2009) **17** 3, 548–553 doi:10.1038/mt.2008.205

Guidelines for Antisense Oligonucleotide Design and Insight Into Splice-modulating Mechanisms

Annemieke Aartsma-Rus¹, Laura van Vliet¹, Marscha Hirschi¹, Anneke AM Janson²,
Hans Heemskerck¹, Christa L de Winter¹, Sjeef de Kimpe², Judith CT van Deutekom²,
Peter AC 't Hoen¹ and Gert-Jan B van Ommen¹

Progerin mRNA



FASE DI RICERCA PRECLINICA (IN VITRO)

DISEGNO SPERIMENTALE

Come scegliere le
sequenze dell'antisenso
e dell'siRNA?

EX11

GGCTCCCACTGCAGCAGCTCGGGGGACCCCGCTGAGTACAACCTGCGCTCGCGCAC
CGTGCTGTGCGGGACCTGCGGGCAGCCTGCCGACAAGGCATCTGCCAGCGGCTCA
GGAGCCCAG*GTG**GGCGG**ACCCATCTCCTCTGGCTCTTCTGCCTCCAGTGTACGGT
CACTCGCAGCTACCGCAGTGTGGGGGGCAGTGGGGGTGGCAGCTTCGGGGACAAT
CTGGTACCCGCTCCTACCTCCTGGGCAACTCCAGCCCCGAACCCAGgtgagttgtctct

IN11

gctttgtctccaaatcctgcaggcgggtccctggatcagagggtaggacgaggtggcctgcaggggggag
agcctgccttctctccgagcccgggggagtgaggagcctcctccacagcctgagtcctagacagcccacct
ctgcatcctgcccctctgtctgagccccagactggaggcaggggcagggctggagtgtgagggatggggg
agatgctacctcccttagggggccaggggaggggtctgggtccaggccctgctgctcacacctctctct
ctgtttctctcttagAGCCCCAGA-dTdT

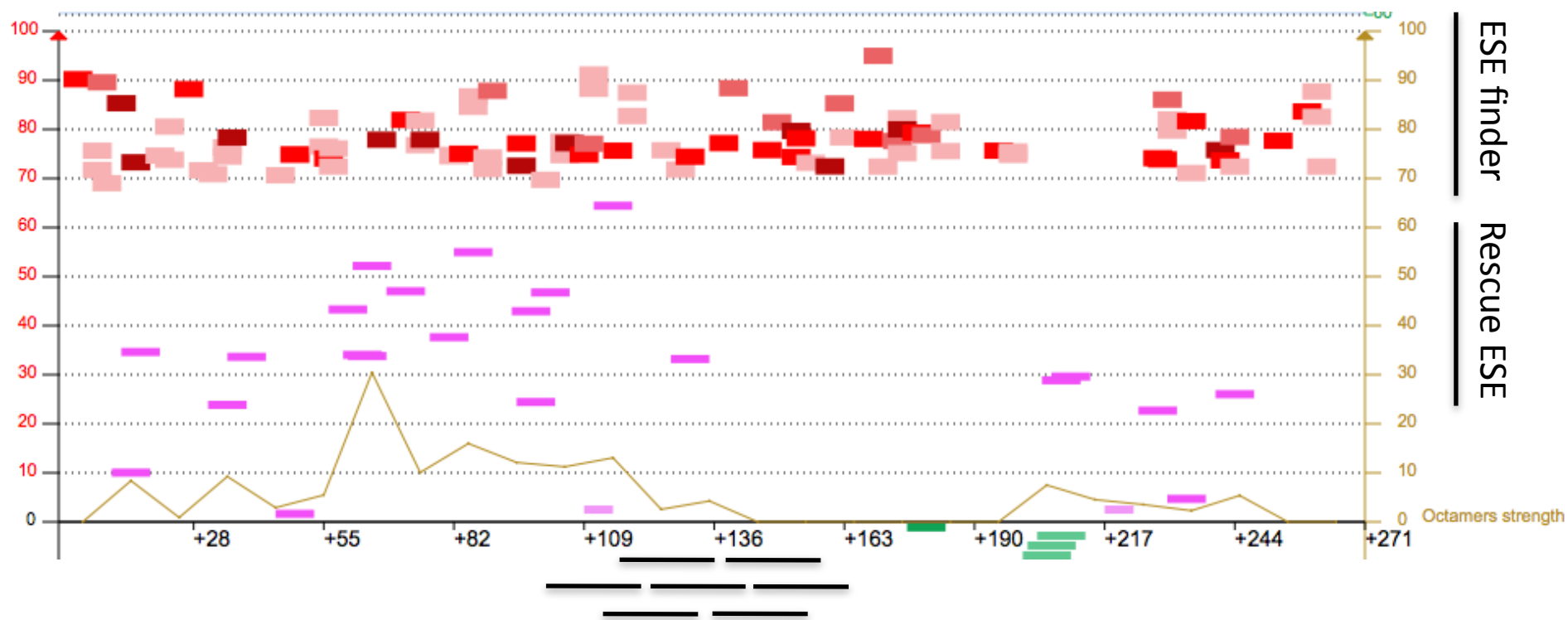
EX12



FASE DI RICERCA PRECLINICA (IN VITRO)

DISEGNO SPERIMENTALE

Come scegliere le
sequenze dell'antisenso
e dell'siRNA?



FASE DI RICERCA PRECLINICA (IN VITRO)

DISEGNO SPERIMENTALE

Come scegliere le
sequenze dell'antisenso
e dell'siRNA?

Attualmente il metodo migliore per identificare le
sequenze antisenso più efficienti è quello empirico



Clonaggio nel vettore di trasferimento di 10/20
sequenze secondo Guidelines e ESE Finder.

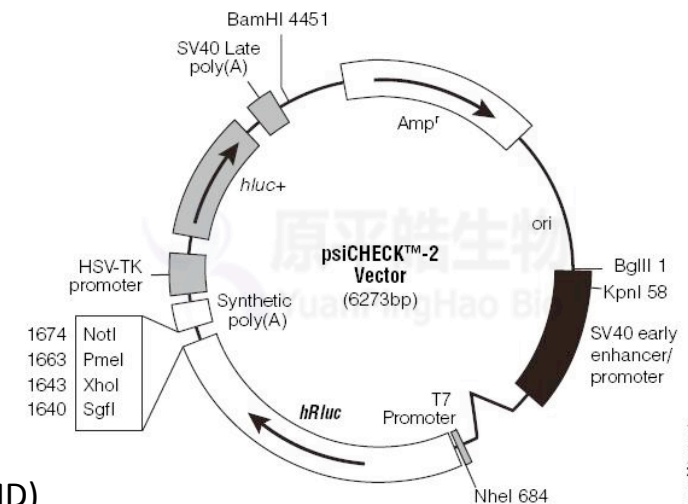
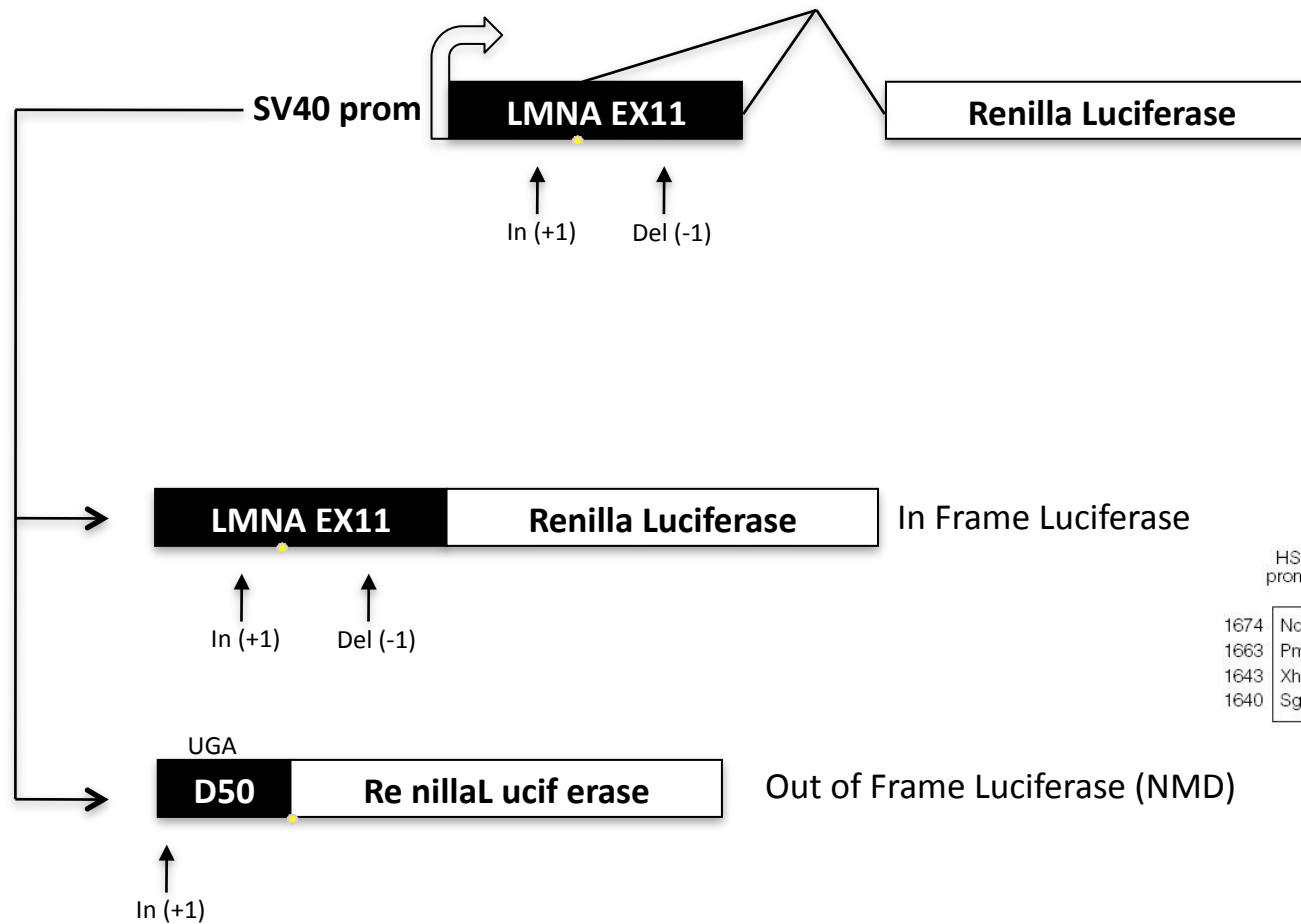


Cotrasfezione di linea cellulare wt
con costrutto reporter



FASE DI RICERCA PRECLINICA (IN VITRO)

COSTRUTTO REPORTER



4945MA10_8A



FASE DI RICERCA PRECLINICA (IN VITRO)

RICAPITOLANDO...

1. Scelta delle sequenze e cotrasfezioni con costrutto reporter
2. Produzione di 3 vettori di trasduzione (sh, anti e sh+anti)
3. Produzione dei lentivettori in 293T
4. Infezione di VSMCs differenziate da iPSCs WT e HGPS

Verifica del fenotipo molecolare a tempi diversi (1,3,5,10gg...):
morfologia dei nuclei, delocalizzazione di HP1alpha e LAPs, FRAP,
TriMeH3K9, presenza di mRNA (e proteina) di Lamina vs Progerina.



FASE DI RICERCA PRECLINICA (IN VIVO)

A) SCELTA DEL MODELLO ANIMALE DELLA MALATTIA HPGS

B) SCELTA DEL VETTORE DI TRASDUZIONE DELLE MOLECOLE TERAPEUTICHE





Lmna -/-

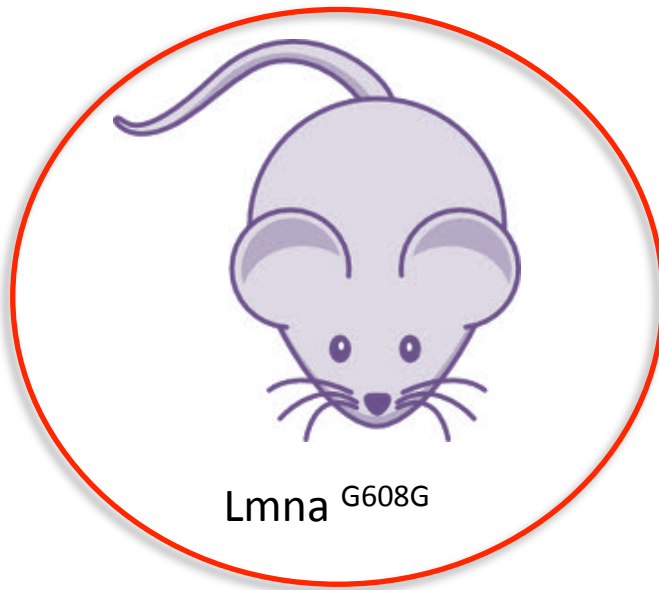


Lmna^{L530P/L530P}



Zmpste24 -/-

**Quale modello animale
scegliere**

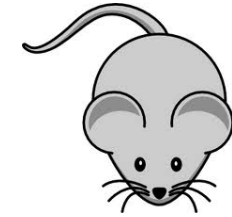


Lmna^{G608G}



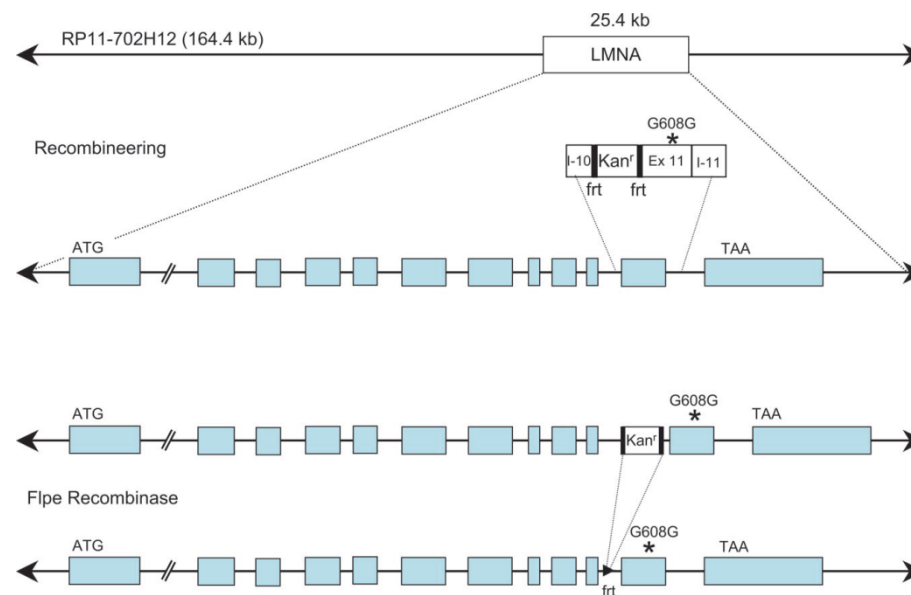
Lmna^{HG/+}

PERCHÉ È STATO SCELTO QUESTO MODELLO?



È L'UNICO MODELLO A PRESENTARE LA MUTAZIONE G608G NEL GENE DELLA LAMINA A !

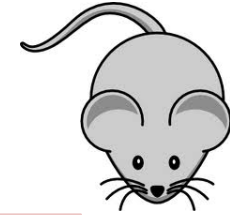
I topi transgenici $Lmna^{G608G}$ contengono il gene umano LMNA mutato all'interno di un cromosoma artificiale batterico BAC



Varga *et al.* 2006



PERCHÉ È STATO SCELTO QUESTO MODELLO?

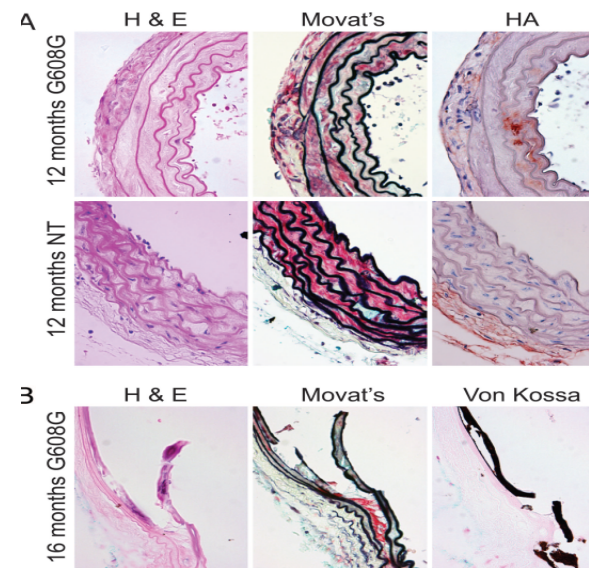


in HGPS la principale causa di morte nel 90% dei casi è la progressiva occlusione delle arterie che porta alla morte per infarto miocardico intorno ai 13 anni di vita



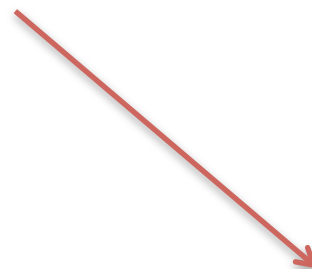
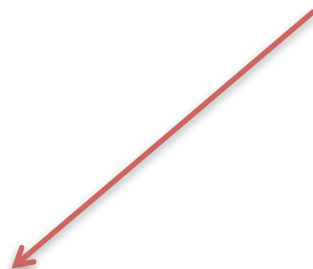
I topi transgenici LMNA G608G non mostrano le caratteristiche fenotipiche esterne tipiche dei bambini progerici, ma tra tutti i modelli murini, sono gli unici a manifestare le anomalie cardiovascolari riscontrate nella HGPS.

- PROGRESSIVA PERDITA DI VMSC
- CALCIFICAZIONI A LIVELLO DELL'AORTA E DELLA CAROTIDE
- DEPOSIZIONE E ACCUMULO DI PROTEOGLICANI





Topo transgenico LMNA^{G608G} (Varga *et al.*)



Chiediamo agli autori di inviarcelo
(GRATIS)

Lo compriamo
(The Jackson Laboratory)

SCelta DEL VETTORE DI TRASDUZIONE

VETTORE AAV6

Perché un vettore AAV?

- Espressione prolungata del transgene
- Bassa immunogenicità
- Assenza di patogenicità
- Ampio tropismo – serotipo dipendente

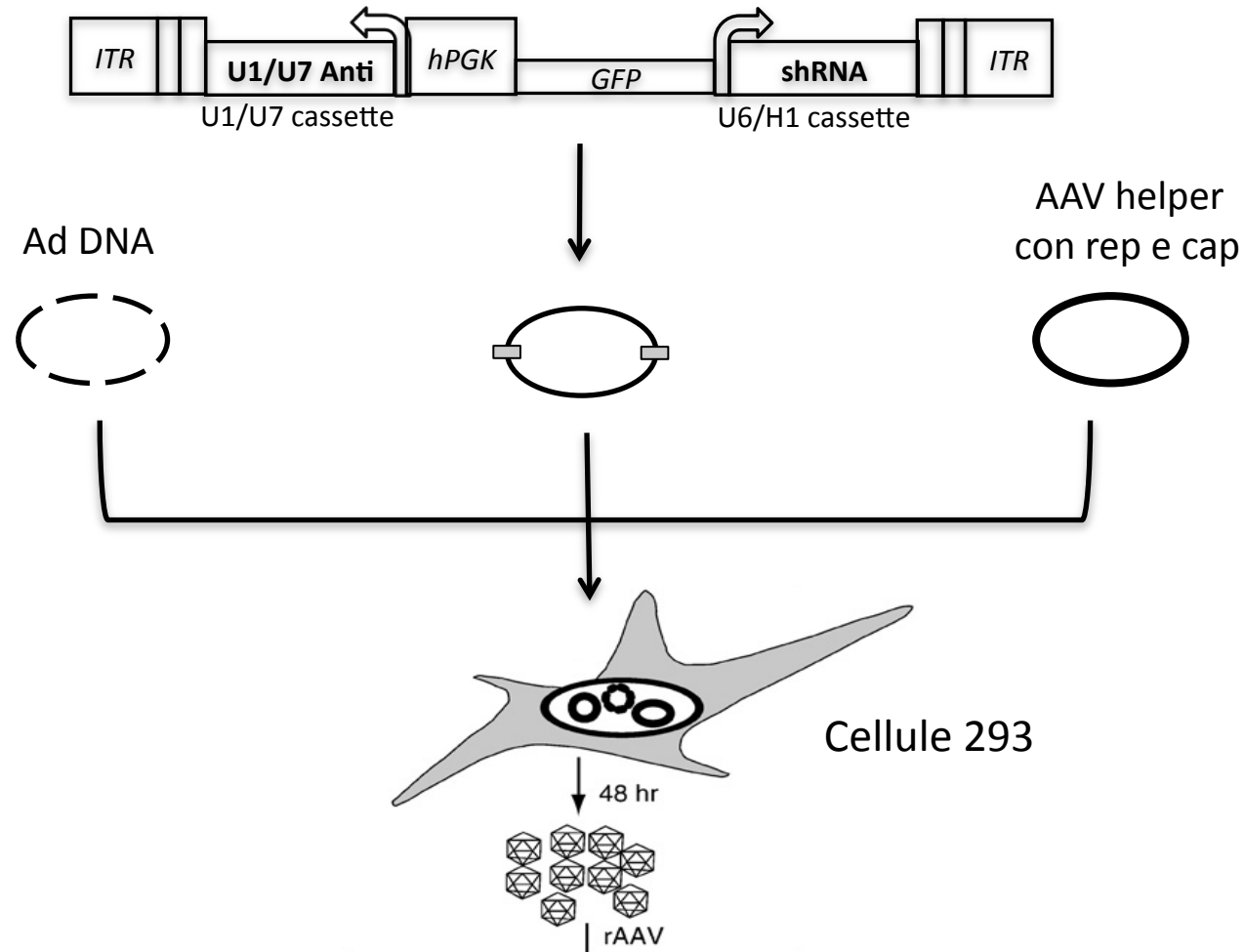
Quale serotipo scegliere?

- Efficiente trasduzione dei tessuti cardiovascolari in seguito a iniezione intracoronarica
- Assenza di infiltrati infiammatori nei tessuti trattati
- Non altera la funzionalità cardiaca

Zincarelli et al.2010



PRODUZIONE DEL VETTORE AAV



Per la purificazione chiediamo ad una company





Iniezione intramuscolare o intracoronarica dei vettori AAV-transgene e AAV-GFP
A 3 mesi di età

Sui topi $Lmna^{G608G}$ trattati, sacrificati a 6 e a 12 settimane dopo l'iniezione, verranno condotte le seguenti analisi:

•Analisi della GFP nei diversi organi , RT-PCR



Efficienza di trasduzione e tropismo

•RT-PCR, Western



Espressione dell'mRNA di progerina e della progerina

•Analisi istologica



Morfologia del nucleo
Sezioni dell'aorta

•Analisi per la ricerca di anticorpi contro l'AAV

VERSO IL CLINICAL TRIAL...

OBIETTIVI:

Fase I



- Valutare la sicurezza/tossicità del vettore a diverse dosi somministrate
- Osservare l'attività/efficacia del vettore per identificare dosi appropriate per gli studi successivi

SCelta VETTORE E MODO DI SOMMINISTRAZIONE:

Summary of clinical trials for treatment of human diseases by AAV gene transfer.

(Kenneth et al.; Hum Gen 2006)

Disease	Transgene	Serotype	Route of administration	Target cell	Clinical trials
a1-Antitrypsin deficiency	a1-Antitrypsin	AAV-2, AAV-1	Intramuscular Skeletal	muscle fibers	Phase I/II
Alzheimer's disease	Nerve growth factor	AAV-2	Intracranial or ex vivo	Neurons	Phase I/II
Canavan's disease	Aspartoacylase	AAV-2	Intracranial	Neurons	Phase I
Cystic fibrosis	CFTR	AAV-2	Nasal, sinus, bronchial epithelium	Lung epithelial cells	Phase I, phase II
Hemophilia B	Factor IX	AAV-2	Intramuscular	Skeletal muscle fibers	Phase I/II
Hemophilia B	Factor IX	AAV-2	Hepatic artery	Hepatocytes	Phase I/II
Leber congenital amaurosis (blindness)	RPE65	AAV-2	Subretinal space	Photoreceptors	Phase I/II approved
Parkinson's disease	Aromatic L-amino acid Decarboxylase	AAV-2	Intracranial	Neurons	Phase I
Muscular dystrophy	Micro-dystrophin	AAV-1	Intramuscular	Skeletal muscle fibers	Phase I initiated
Parkinson's disease	Glutamic acid decarboxylase	AAV-2	Intracranial	Neurons	Phase I

SCelta VETTORE E MODO DI SOMMINISTRAZIONE:

**Design of a Phase 1/2 Trial of Intracoronary Administration
of AAV1/SERCA2a in Patients With Heart Failure**

Roger et al., Journal of Cardiac Failure 2008



IMPOSTAZIONE DEL TRIAL:

3 o 4 coorti →

Minimo 3 pazienti ciascuna

3 o 4 dosaggi crescenti:

	<i>Numero coorte</i>			
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
Dose (VG)	2.1x10e12	6.9x10e12	2.1x10e13	6.9x10e13
Numero di pazienti	3	3	3	3

Somministrazioni sequenziali:

- Ciascun paziente trattato con un'unica iniezione
- 2 settimane tra l'iniezione di un paziente ed il successivo della stessa coorte
- 4 settimane tra l'iniezione dell'ultimo paziente di una coorte ed il primo della coorte successiva

Open-label trial →

Nessun paziente verrà trattato con placebo

RECLUTAMENTO PAZIENTI:

N. partecipanti → Da 9 a 12

Intervallo di età → 8-11 anni

Criteri di inclusione:

- ✓ Pazienti recanti la mutazione G608G;
- ✓ Pazienti con adeguate funzioni vitali definite da parametri clinici (da determinare);
- ✓ Non assunzione di medicinali contenenti aspirina o altri che potrebbero alterare la funzione delle piastrine entro 7 giorni dal trattamento;
- ✓ (...)

Aver già partecipato a *trial* per cure farmacologiche non costituisce motivo di esclusione purché il trattamento sia terminato (da un periodo di tempo da stabilire).

Criteri di esclusione:

- ✗ Avere parametri clinici che non rientrano nei valori stabiliti (da definire);
- ✗ Essere sieropositivi per epatite B, epatite C o HIV;
- ✗ Avere già ricevuto un trattamento con AAV;
- ✗ Uso di anticoagulanti nei 7 giorni precedenti al trattamento o avere problemi di coagulazione;
- ✗ Uso di antibiotici nei 30 giorni precedenti al trattamento;
- ✗ Uso di farmaci immunosoppressori nei tre mesi precedenti al reclutamento;
- ✗ Avere significative anomalie nell'ECG durante le visite di screening o aver avuto problemi cardiaci (tra cui infarto) nei 6 mesi precedenti;
- ✗ Avere una storia clinica di immunodeficienza o altre condizioni che il ricercatore riterrà rischiose per il paziente o non compatibili con il trattamento.

Si dovrà inoltre valutare se sospendere o meno eventuali terapie farmaceutiche già in corso nei pazienti trattati (Es: ormone della crescita).

SCREENING PRE-TRATTAMENTO:

➤ ***Scopo: valutare l'eleggibilità dei pazienti candidati e collezionare dati clinici da confrontare con quelli successivi al trattamento***

- Storia medica
- Esame fisico
- Misura di pressione sanguigna, frequenza cardiaca, frequenza respiratoria, temperatura
- Analisi del sangue e delle urine
- Analisi cardiologica ed ECG
- Ecocardiogramma
- Ecodoppler carotideo
- Esame della funzione polmonare
- Visita neurologica
- MRI
- Biopsia epidermica e muscolare
- DEXA/MOC per lo studio della composizione ossea e corporea (massa grassa, massa magra)
- Visita ortopedica
- Visita endocrinologica
- Visita dermatologica (compresa analisi dei bulbi piliferi)
- Visita oftalmologica
- Visita audiologica
- Visita dentistica (compresi raggi X)
- Visita nutrizionale
- (...)

ANALISI E MONITORAGGIO

POST-TRATTAMENTO:

Verrà ripetuta periodicamente la quasi totalità dei test praticati prima del trattamento

Particolare attenzione per:

- Cuore
- Polmoni
- Sangue e urine



Valori nella norma?

Risposta immunitaria?



Conta dei globuli bianchi
Ricerca di anticorpi anti-AAV

Efficienza di trasduzione?



Analizzare la presenza del genoma del vettore nel sangue, nel liquido seminale (quando disponibile) e nelle biopsie tissutali

RT-PCR

Efficacia del trattamento?



Osservare l'espressione della progerina (**diminuzione?**)
Osservare il fenotipo dei nuclei delle cellule prelevate (**miglioramento?**)

RT-PCR
Immunofluorescenza

Analisi istologica

ANALISI E MONITORAGGIO

POST-TRATTAMENTO:

	Screening	Pretrattamento	Giorno			Mese					Anni	
			0	7	14	1	2	3	6	12	18	2 - 15
Somministrazione vettore			x									
Analisi genetica per G608G	x											
Generale	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	
Analisi sangue e urine	x	x		x								
Sistema cardiovascolare												
Analisi cardiologica	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
ECG	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Ecocardiogramma	x	x				x	x	x	x	x	x	
Ecodoppler carotideo	x	x				x	x	x	x	x	x	
Funzione polmonare	x	x		x	x	x		x	x	x	x	
Visita neurologica	x	x										
MRI	x							x	x	x	x	
Biopsie tissutali	x			x		x		x	x	x	x	
DEXA/MOC	x							x	x	x	x	
Visita ortopedica	x							x	x	x	x	
Visita endocrinologica	x								x		x	
Visita dermatologica	x								x		x	
Visita oftalmologica	x									x	x	
Visita audiologica	x									x	x	
Visita dentistica	x										x	
Visita nutrizionale	x									x	x	
Correlati al vettore												
Anticorpi anti-AAV		x		x	x	x	x	x	x	x	x	
Follow-up richiesto dalla FDA												x
Genoma del vettore nei tessuti				x	x	x	x	x	x	x	x	
Espressione progerina				x	x	x	x	x	x	x	x	

DURATA DELLO STUDIO:

Tempo stimato per il reclutamento e lo screening dei pazienti:

≈ 1 anno

Tempo che intercorre tra il trattamento del primo paziente e dell'ultimo:

≈ 2 anni

Durata del monitoraggio e degli esami post-trattamento:

1 anno e mezzo

Inoltre secondo l'FDA, ciascun paziente che partecipa a trial di terapia genica deve essere monitorato per i 15 anni successivi la somministrazione del vettore



Durata dello studio: 18 anni
(teorica)

Tot: circa 4,5 anni



Elaborazione dei dati raccolti



Fase II?

RICERCA DEI FINANZIAMENTI:

- Negli ultimi anni ha finanziato tutti i principali studi sulla progeria
- Sta attualmente finanziando i clinical trial per una cura farmacologica della progeria



**When things are difficult, the question we should be asking is not
“why did this happen to us?” but, “now that it has happened,
what can we do to make things better?”**

from When Bad Things Happen To Good People

©1981 Schoken Books, Inc., New York

Grazie per l'attenzione!

COSTI:

Chimici

Plasticheria/vetreria

Clonaggi (PCR, Restrizione, Ligasi, CIP, Vettori, Preparazioni di DNA plasmidico e sequenziamento) **€ 300/clone ca = €8000ca**

Trasfezioni (Liposomi, Terreni, buffer...)

Luciferasi (Luminometro, buffer, piastre)

RNA (RT-PCR e Northern, P32, apparati di corsa e di blotting)

Proteine (Anticorpi: Lamina AC, normalizzatori es GAPDH, LAP2, HP1, Lamina B, TriMeH3K9, gel e apparati di corsa e di blotting) **€ 3000ca**

HAEC cell line: €900 ca

Topo progerico: €200 ca

Stanza cellule attrezzata (cappa, incubatore, ultracentrifuga, microscopio a fluorescenza) e **Laboratorio di biologia attrezzato** (centrifughe, termociclatori, termomixer, bilancini, cappa chimica etc etc)

BIBLIOGRAFIA

Comparative Cardiac Gene Delivery of Adeno-Associated Virus Serotypes 1–9 reveals that AAV6 Mediates the Most Efficient Transduction in Mouse Heart

Zincarelli et al. 2010

Body-wide gene therapy of Duchenne muscular dystrophy in the mdx mouse model

Denti et al. 2006 (PNAS)

Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome

Paola Scaffidi and Tom Misteli (Nat. Med. 2005)

Progeria syndromes and ageing: what is the connection?

Christopher R. Burtner and Brian K. Kennedy (Molecular cell biology 2010)*

Activating the synthesis of progerin, the mutant prelamin A in Hutchinson–Gilford progeria syndrome, with antisense oligonucleotides

Fong et al. 2009 (Human Molecular Genetics)

Accelerated ageing: from mechanism to therapy through animal models

Osorio et al. 2009 (Transgenic Res)

A farnesyltransferase inhibitor prevents both the onset and late progression of cardiovascular disease in a progeria mouse model

Capell et al.2008 (PNAS)

Progressive vascular smooth muscle cell defects in a mouse model of Hutchinson-Gilford progeria syndrome.

Varga R, *et al. (2006) Proc Natl Acad Sci USA 103:3250–3255*

New Approaches to Progeria

Mark W. Kieran et al.2007

BIBLIOGRAFIA

Correction of cellular phenotypes of Hutchinson-Gilford Progeria cells by RNA interference
Huang et al. 2005 (Human Genetics)

Blocking protein farnesylation improves nuclear shape abnormalities in keratinocytes of mice expressing
The prelamin A variant in Hutchinson-Gilford progeria syndrome
Wang et al. 2010 (Nucleus)

Werner and Hutchinson–Gilford progeria syndromes: mechanistic basis of human progeroid diseases
Kudlow et al. 2007 (Nature)

Hutchinson–Gilford progeria mutant lamin A primarily targets human vascular cells as detected
by an anti-Lamin A G608G antibody
McClintock et al. 2005 (PNAS)

A progeroid syndrome in mice is caused by defects in A-type lamins
Mounkes et al. 2003 (Nature)

Analysis of AAV Serotypes 1–9 Mediated Gene Expression and Tropism in Mice After Systemic Injection
Zincarelli et al. 2008 Molecular Therapy

The next step in gene delivery: Molecular engineering of adeno-associated virus serotypes
Wang et al. 2010 Journal of Molecular and Cellular Cardiology

Engineering Liver-detargeted AAV9 Vectors for Cardiac and Musculoskeletal Gene Transfer
Pulicherla et al. 2010 Molecular Therapy

BIBLIOGRAFIA

Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector
Mark A. Kay et al. 2000 Nature Genetics

Viral vectors: from virology to transgene expression
D Bouard, N Alazard-Dany and F-L Cosset British Journal of Pharmacology (2009)

Treatment of human disease by adeno-associated viral gene transfer
Warrington et al. 2006 (Human Genetics)

Design of a Phase 1/2 Trial of Intracoronary Administration of AAV1/SERCA2a in Patients With Heart Failure
Hajjar, et al. 2008 Journal of Cardiac Failure

Immune Responses to AAV in Clinical Trials
Federico Mingozzi¹ and Katherine A. High^{1,2,*} *Current Gene Therapy*, 2007,

Administration of a Replication-Deficient Adeno-Associated Virus Gene Transfer Vector Expressing the Human *CLN2* cDNA to the Brain of Children with Late Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis
Crystal (Human Gene Therapy 2004)

Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging
Varela et al. 2008 Nature Medicine

Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation
Varela et al. 2005 Nature

BIBLIOGRAFIA

Chimeric adeno-associated virus/antisense U1 small nuclear RNA effectively rescues dystrophin synthesis and muscle function by local treatment of mdx mice.

Denti et al. 2006 (Hum.Gene Ther.)

Guidelines for antisense oligonucleotide design and insight into splice-modulating mechanisms.

Aartsma-Rus et al. (Mol Ther. 2009)

Engineering exon-skipping vectors expressing U7 snRNA constructs for Duchenne muscular dystrophy gene therapy.

Goyenvalle A. et al. (Methods Mol Biol. 2011)

Recapitulation of premature ageing with iPSCs from Hutchinson-Gilford progeria syndrome.

Liu et al. (Nature. 2011)

A human iPSC model of Hutchinson Gilford Progeria reveals vascular smooth muscle and mesenchymal stem cell defects.

Zhang et al. Cell Stem Cell. 2011

Lamin A Truncation in Hutchinson-Gilford Progeria

De sandre-Giovannoli et al. (Science 2003)

Molecular bases of progeroid syndromes

Navarro et al. (Human Molecular Genetics,2006)