



NUOVE PROSPETTIVE DI TERAPIA GENICA NELLE MALATTIE RETINICHE

Francesco Parmeggiani

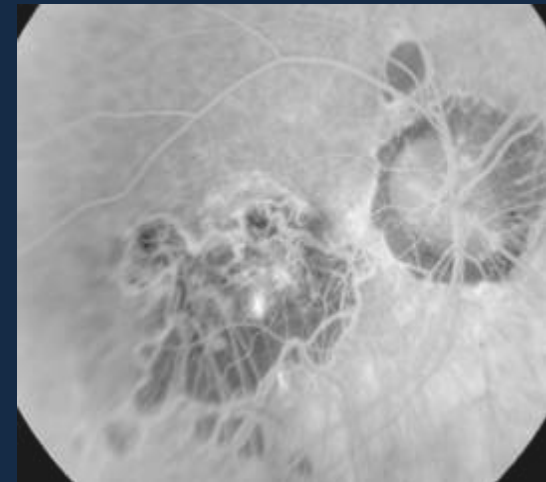
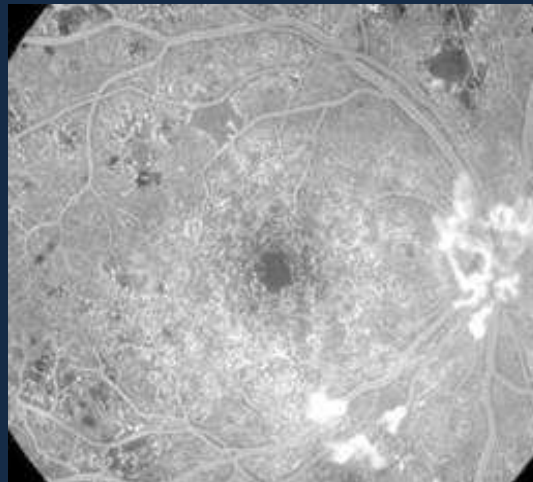
Unità Operativa di Clinica Oculistica - Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara

Società Medico Chirurgica - Attualità in Oftalmologia
Cona (Ferrara), 4 Maggio 2013

MALATTIE DELLA RETINA

sono le cause più frequenti di cecità legale nei Paesi Europei e Nord Americani

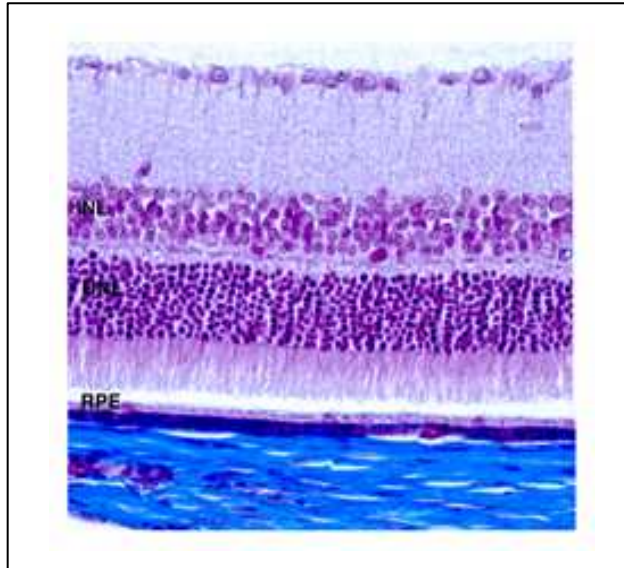
- Degenerazione Maculare Legata all'Età (DMLE specie in forma NV)
- Retinopatia Diabetica
- Corioretinosi Degenerativa Miopica



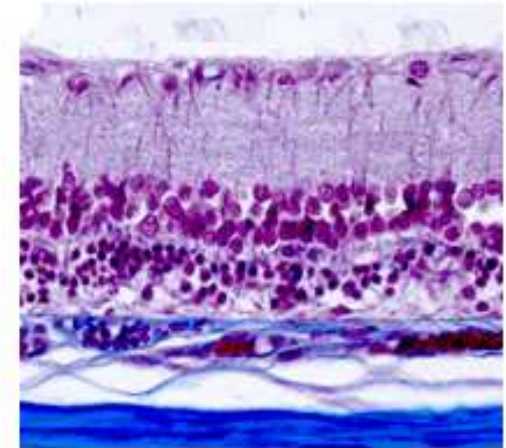
rappresentano insieme circa il 90% dei casi di ipovisione o cecità

nonostante la loro estrema variabilità patogenetica e fenotipica

TUTTE LE RETINOPATIE sono caratterizzate da



- destrutturazione di cellule perenni (FR \cong cellule SNC)
- **SPESSE** associata a perdita irreversibile della vista



per le quali sono disponibili protocolli sempre più articolati e costosi

SOLO per la cura delle complicanze MA NON delle malattie



insieme ai **FATTORI DI RISCHIO** tradizionalmente correlati ad insorgenza e/o progressione di tutte le più severe forme di retinopatia

1. invecchiamento
2. disordini sistemici (DM e IPA ...)
3. stili di vita (fumo di sigaretta ...)
4. abitudini alimentari (colesterolo ...)
5. stress ossidativi (luce solare ...)

è assolutamente necessario dare una marcata rilevanza a

6. predisposizioni genetiche (polimorfismi comuni)
7. fattori epigenetici

Haines JL et al. Science 2005; Yu Y et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012

**Complement Factor H Variant
Increases the Risk of Age-Related
Macular Degeneration**



che hanno letteralmente rivoluzionato il profilo patogenetico della DMLE

da allora sono state progressivamente individuate numerose **VARIANTI GENICHE** correlate ad un maggior rischio DMLE - *di cui almeno 11 confermate da metanalisi e/o GWAS*

TABLE 1: Main AMD-susceptibility genetic loci.

Parmeggiani F et al. Mediators Inflamm. 2012

| Locus | Role in immunoinflammatory pathways | Possibility of AMD-risk elevation |
|-------|--|--|
| CFH | Yes (complement system) | High (in carriers of polymorphic allele) |
| ARMS2 | Not clarified | High (in carriers of polymorphic allele) |
| HTRA1 | Possible (complement system) | High (in carriers of polymorphic allele) |
| CFB | Yes (complement system) | Intermediate (in carriers of wild allele) |
| C2 | Yes (complement system) | Intermediate (in carriers of wild allele) |
| C3 | Yes (complement system) | Intermediate (in carriers of polymorphic allele) |
| CFI | Yes (complement system) | Low (in carriers of polymorphic allele) |
| TIMP3 | Yes (immunity in extracellular matrix) | Low (in carriers of polymorphic allele) |
| LIPC | Not clarified | Low (in carriers of polymorphic allele) |
| ABCR | No | Low (in carriers of polymorphic allele) |
| APOE | No | Low (in carriers of polymorphic allele) |

Legend: CFH: complement factor H; ARMS2: age-related maculopathy susceptibility 2; HTRA1: high-temperature requirement factor A of serine peptidase 1; CFB: complement factor B; C2: complement component 2; C3: complement component 3; CFI: complement factor I; TIMP3: tissue inhibitor of metalloproteinases 3; LIPC: hepatic lipase gene; ABCR: ATP-binding cassette transporter; APOE: apolipoprotein E.

quota di ereditarietà nell'insorgenza di DMLE è stimata del 70-75%

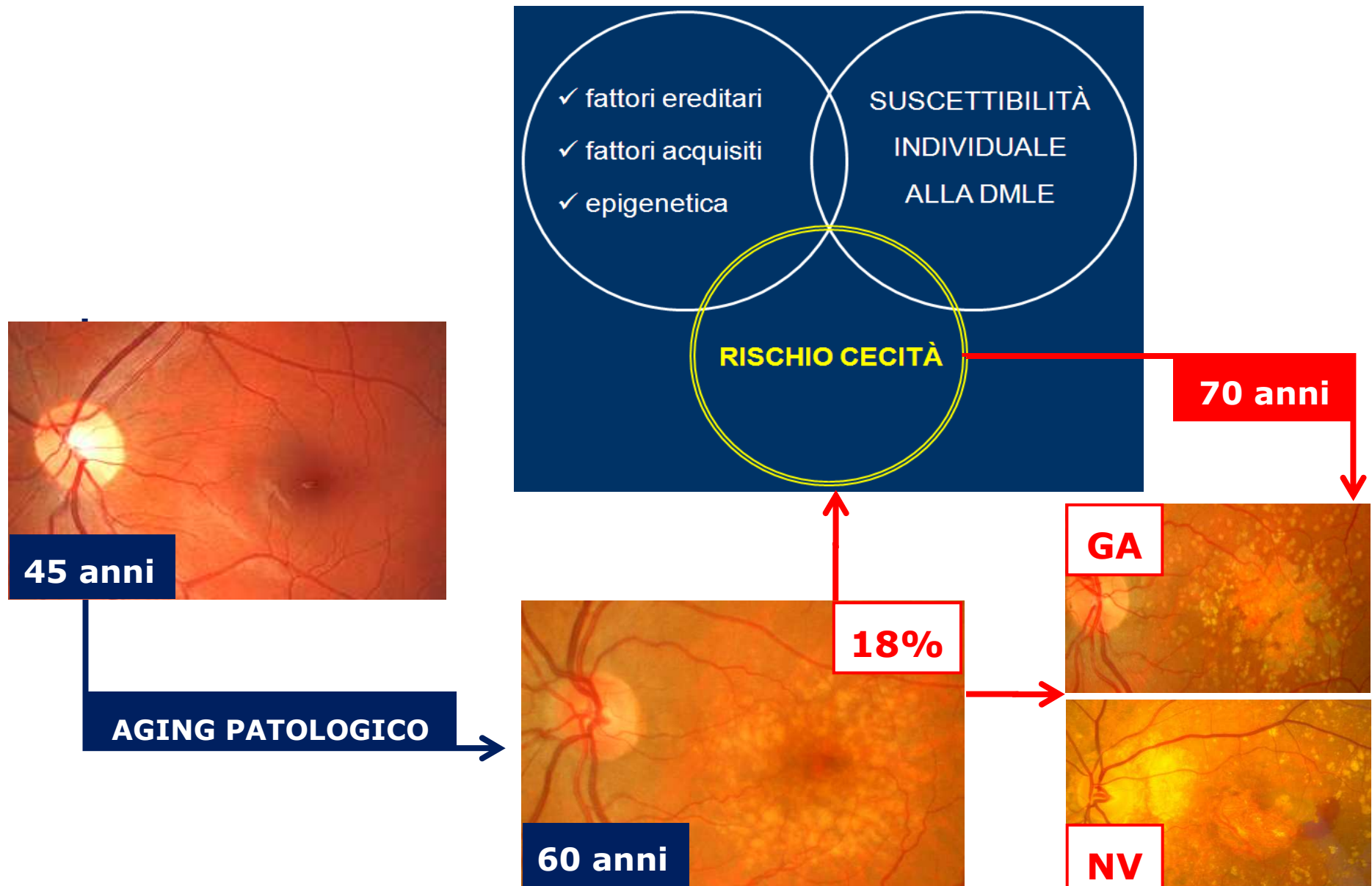
considerando sia:

(A) mosaicismi multigenici predisponenti

(B) condizioni epigenetiche scatenanti

ossia le modalità con le quali un fattore di rischio non genetico può fortemente influenzare il livello d'espressività fenotipica della malattia in base al background genotipico individuale su cui agisce

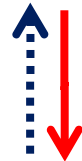
nella pratica clinica, questo "intrecciato" **ALGORITMO PATOGENETICO** è sempre più in grado di spiegare la diversa suscettibilità individuale alla DMLE definendo il RISCHIO CECITÀ



in quest'ambito di grande impatto socio-sanitario è quanto mai opportuno creare specifici **PERCORSI CLINICO-GENETICI** allo scopo di sistematizzare le attuali possibilità di MONITORAGGIO DIAGNOSTICO PERSONALIZZATO

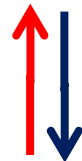
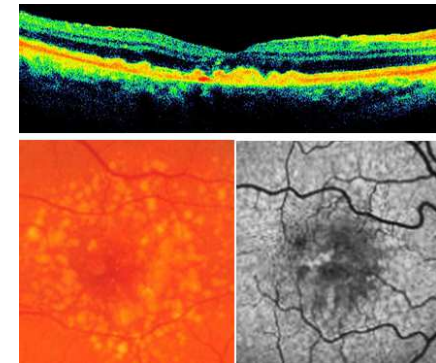
Oculistica Ambulatoriale ASL

ATTIVITÀ DI SCREENING ED INVIO DEL PAZIENTE
(ACCORDI INTER-AZIENDALI DEDICATI)



UO di Clinica Oculistica AOU

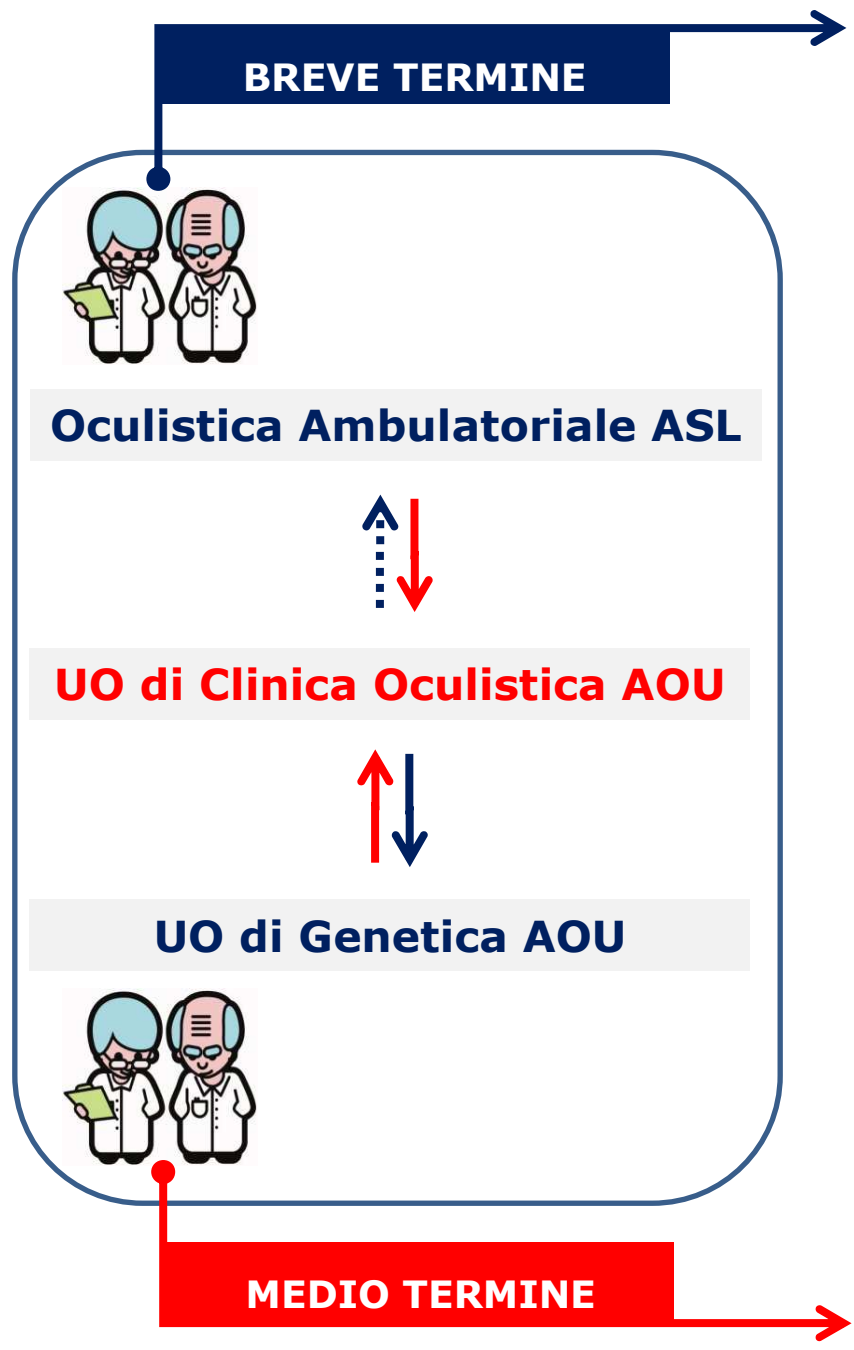
ATTIVITÀ DI FENOTIPIZZAZIONE E PRESA IN CARICO
DEL PAZIENTE (SERVIZI AMBULATORIALI DEDICATI)



UO di Genetica AOU

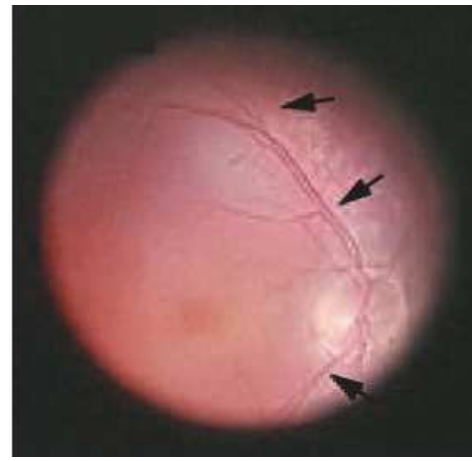
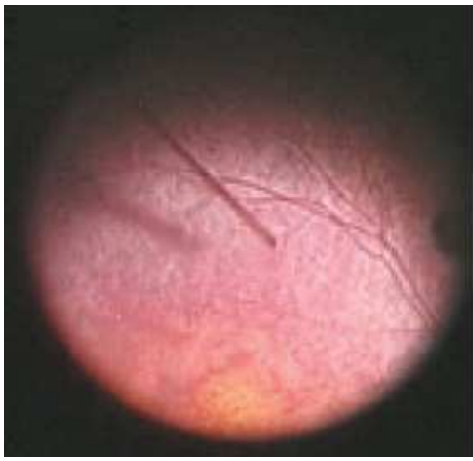
ATTIVITÀ DI GENOTIPIZZAZIONE E CONSERVAZIONE
DEL DNA (ANALISI PERIODICHE COMULATIVE)





SELEZIONE DI PAZIENTI E BIOBANKING
 in prospettiva di
TERAPIA GENICA DELLA DMLE

occhio è un sistema “chiuso” ed immuno-privilegiato → struttura “ideale” per la somministrazione di vettori virali (i.e. iniezione SR)



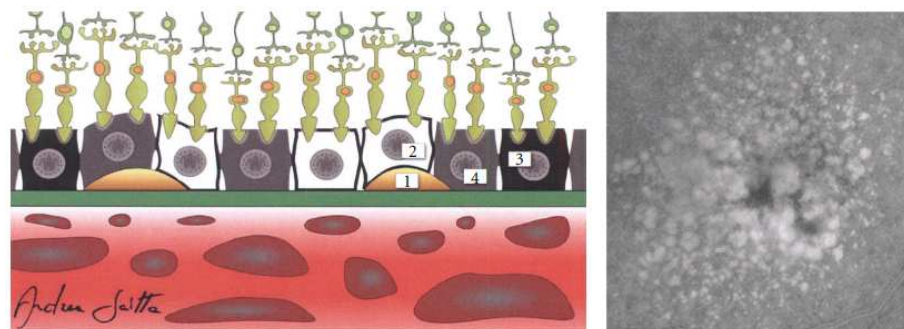
TERAPIA TRANSFETTANTE GENICA DELLA DMLE

strategia preventiva potenzialmente in grado di ↓ rischi di cecità (bassi costi per procedura singola)

PUNTI A FAVORE

1) le DRUSEN si sviluppano nell'EPR

lesioni elementari della DMLE che inizialmente non riducono in modo marcato la funzione fotorecettoriale



2) l'EPR umano è già stato TRANSFETTATO con successo

a partire dal 2008, mediante l'iniezione sottoretinica del vettore AAV2.hRPE65v2 in giovani pazienti ciechi dalla nascita per LCA-2 causata da mutazioni del gene RPE65 (omozigosi)

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

BRIEF REPORT

Safety and Efficacy of Gene Transfer for Leber's Congenital Amaurosis

Albert M. Maguire, M.D., Francesca Simonelli, M.D., Eric A. Pierce, M.D., Ph.D., Edward N. Pugh, Jr., Ph.D., Federico Mingozzi, Ph.D., Jeannette Bennicelli, Ph.D., Sandro Banfi, M.D., Kathleen A. Marshall, C.O.T., Francesco Testa, M.D., Enrico M. Surace, D.V.M., Settimio Rossi, M.D., Arkady Lyubarsky, Ph.D., Valder R. Arruda, M.D., Barbara Konkle, M.D., Edwin Stone, M.D., Ph.D., Junwei Sun, M.S., Jonathan Jacobs, Ph.D., Lou Dell'Osso, Ph.D., Richard Hertle, M.D., Jian-xing Ma, M.D., Ph.D., T. Michael Redmond, Ph.D., Xiaosong Zhu, M.D., Bernd Hauck, Ph.D., Olga Zelenai, Ph.D., Kenneth S. Shindler, M.D., Ph.D., Maureen G. Maguire, Ph.D., J. Fraser Wright, Ph.D., Nicholas J. Volpe, M.D., Jennifer Wellman McDonnell, M.S., Alberto Auricchio, M.D., Katherine A. High, M.D., and Jean Bennett, M.D., Ph.D.

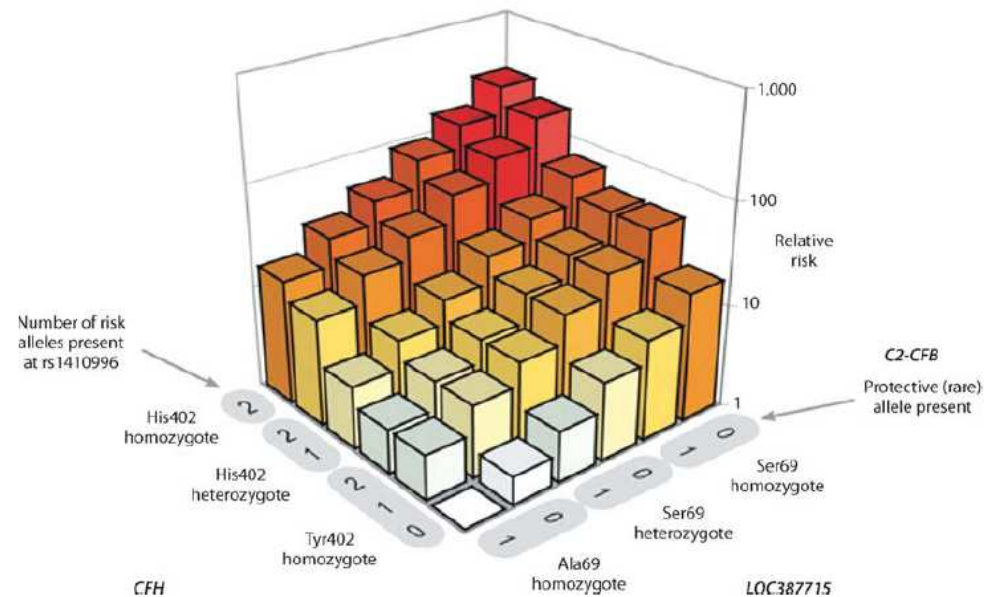
TERAPIA TRANSFETTANTE GENICA DELLA DMLE

PUNTI A FAVORE

3) **sebbene la DMLE sia complessa e multigenica, il suo RR è riconosciuto essere molto aumentato da un numero limitato di SNPs (già identificati)**
che spesso agiscono con meccanismi associativi di aumento esponenziale del RR (esempio di mosaicismismo genico di 5 SNPs: CFH-rs1061170, CFH-rs1410996, ARMS2-rs10490924, C2/CFB-rs4151667 e C2/CFB-rs9332739)

PRINCIPALI SNPs ↔ DMLE

1. **rs1061170 del gene CFH**
2. rs403846 del gene CFH
3. rs10490924 del gene ARMS2
4. rs11200638 del gene HTRA1
5. rs2230199 del gene C3
6. rs641153 del gene CFB
7. rs4151667 del gene CFB
8. rs547154 del gene C2
9. rs9332739 del gene C2





MIUR

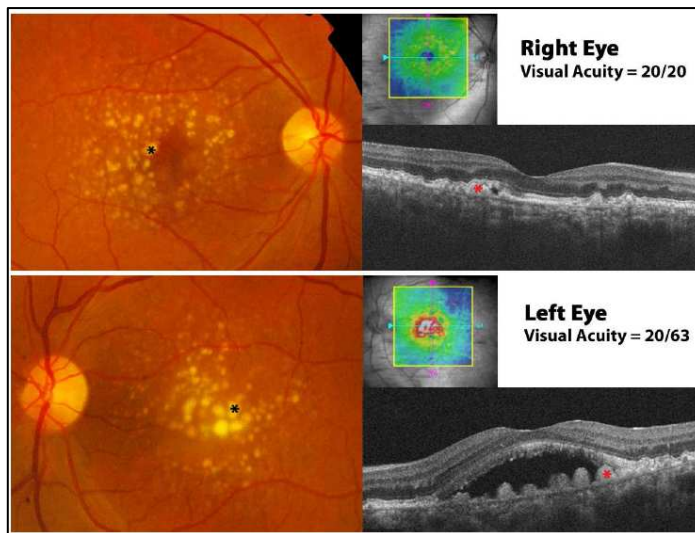
PRIN

RISULTATI PRELIMINARI

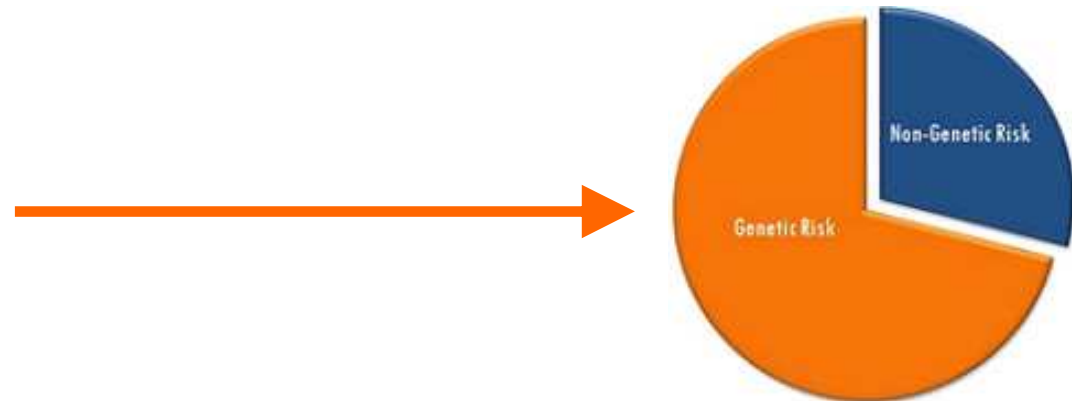
(a 12 di 24 mesi)

- allele polimorfico C del SNP rs1061170 del gene CFH ha una frequenza più elevata nei pazienti con AMD NV rispetto a quanto osservato in controlli sani (**83% vs 51%**)
- omozigosi CC maggiormente presente nei pazienti con AMD NV di età < 76 aa (**28% vs 19%**)

INDICANDO COME I FATTORI DI RISCHIO GENETICI RISULTINO PIÙ IMPORTANTI OVE MENO HA INCISO L'INVECCHIAMENTO



Caso FE-P56 (M, 52 aa, rs1061170-CFH CC)



coinvolgere questa tipologia di pazienti nello sviluppo di **modelli sperimentali altamente traslazionali**, per superare (in tempi brevi) le problematiche applicative

TERAPIA TRANSFETTANTE GENICA DELLA DMLE

PROBLEMATICHE APPLICATIVE

1) la mancanza di una prova di plausibilità per “giustificare” i rischi di eventi avversi (finora NON osservati) di una terapia genica in occhi vedenti → “PROOF OF CONCEPT”

strettamente associata alla **mancanza di modelli sperimentali** in grado di simulare adeguatamente la patogenesi della DMLE umana a livello dell’EPR (drusen)

IOVS, September 2008, Vol. 49, No. 9

Evaluation of Adenovirus-Delivered Human CD59 as a Potential Therapy for AMD in a Model of Human Membrane Attack Complex Formation on Murine RPE

Kasmir Ramo, Siobhan M. Cashman, and Rajendra Kumar-Singh

ORIGINAL ARTICLE

Adenovirus-mediated delivery of CD46 attenuates the alternative complement pathway on RPE: implications for age-related macular degeneration

JH Sweigard^{1,2}, SM Cashman¹ and R Kumar-Singh^{1,2}

Gene Therapy (2011) 18, 613–621
© 2011 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 0969-7128/11

PLoS ONE | www.plosone.org

1

April 2011 | Volume 6 | Issue 4 | e19078

A Non Membrane-Targeted Human Soluble CD59 Attenuates Choroidal Neovascularization in a Model of Age Related Macular Degeneration

Siobhan M. Cashman³, Kasmir Ramo³, Rajendra Kumar-Singh*

Department of Ophthalmology, Tufts University School of Medicine, Boston, Massachusetts, United States of America

ClinicalTrials.gov

A service of the U.S. National Institutes of Health

03/05/2013

List Results

Refine Search

Results by Topic

Results on Map

Found no studies with search of: age-related macular degeneration, viral vector

Query Suggestions:

Arguments of AND in expression, age-related macular degeneration AND viral vector, not found together
Drop argument, viral vector [age-related macular degeneration](#)
Drop argument, age-related macular degeneration [viral vector](#)

"PROOF OF CONCEPT"

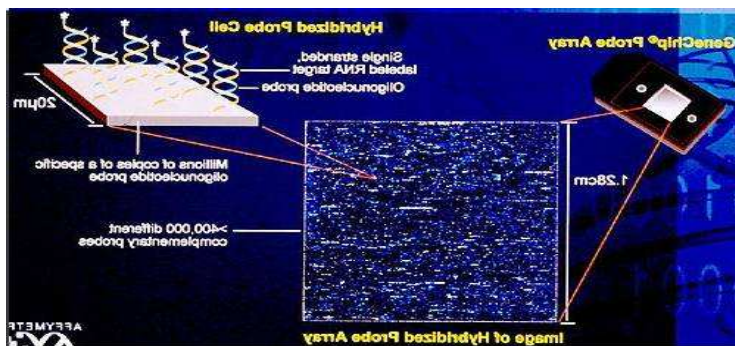
oggi verificabile a costi relativamente bassi grazie alla disponibilità di

TECNOLOGIE AVANZATE

➤ **analisi multi-sequenziale ed automatizzata del DNA**

REAL-TIME PCR system , MICROARRAY-APEX reaction, GENECHIP analysis oppure NEXT GENERATION sequencing


*coadiuvata dall'interpretazione dei dati genici con **programmi d'intelligenza artificiale***



➤ cellule staminali pluripotenti indotte (iPS cells)

con vettori virali per "correggerle" geneticamente e creazione di EPRs derivati da queste

iPS

| | | | |
|---|--|---|--|
|  <p>Ministero della Salute Direzione Generale della Ricerca Sanitaria e Biomedica e della Vigilanza sugli Enti BANDO 2011-2012 PROGETTI DI RICERCA PROGETTO COMPLETO</p> | | Project Title: Development of autologous induced pluripotent stem cells from selected adult patients with age-related macular degeneration for identification of novel gene-based therapies | |
| Project Code: PE-2011-02348010 | | Principal Investigator: PARMEGGIANI FRANCESCO | |
| Research Type: Biomedical/Biomedica | | Applicant Institution: Emilia-Romagna | |
| Project Type: Italian researcher abroad/Progetti con ricercatore | | | |

Italian Researcher Abroad - Operative Unit Abroad

Name and Surname: **Federico Mingozzi**

Foreign Institution: Children's Hospital of Philadelphia, University of Pennsylvania

Department/Division/Laboratory: Center for Cellular and Molecular Therapeutics

City-State and Country: Philadelphia, Pennsylvania, United States of America

N.Years Residence Abroad: 12

Email: mingozzi@email.chop.edu Phone: 001-267-426-0929

| Investigators, Institution and Role on Project | | |
|--|-------------------------|--|
| | Key Personnel | Institution/Org./Pos. |
| 1 | Antonia Follenzi | Università degli Studi del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro" |
| 2 | Michele Rubini | Unità Operativa di Genetica Medica, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara (Dipartimento di Scienze biomediche e chirurgico specialistiche, Università degli Studi di Ferrara) |
| 3 | Gianluca Aguiari | Dipartimento di Scienze biomediche e chirurgico specialistiche, Università degli Studi di Ferrara |

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

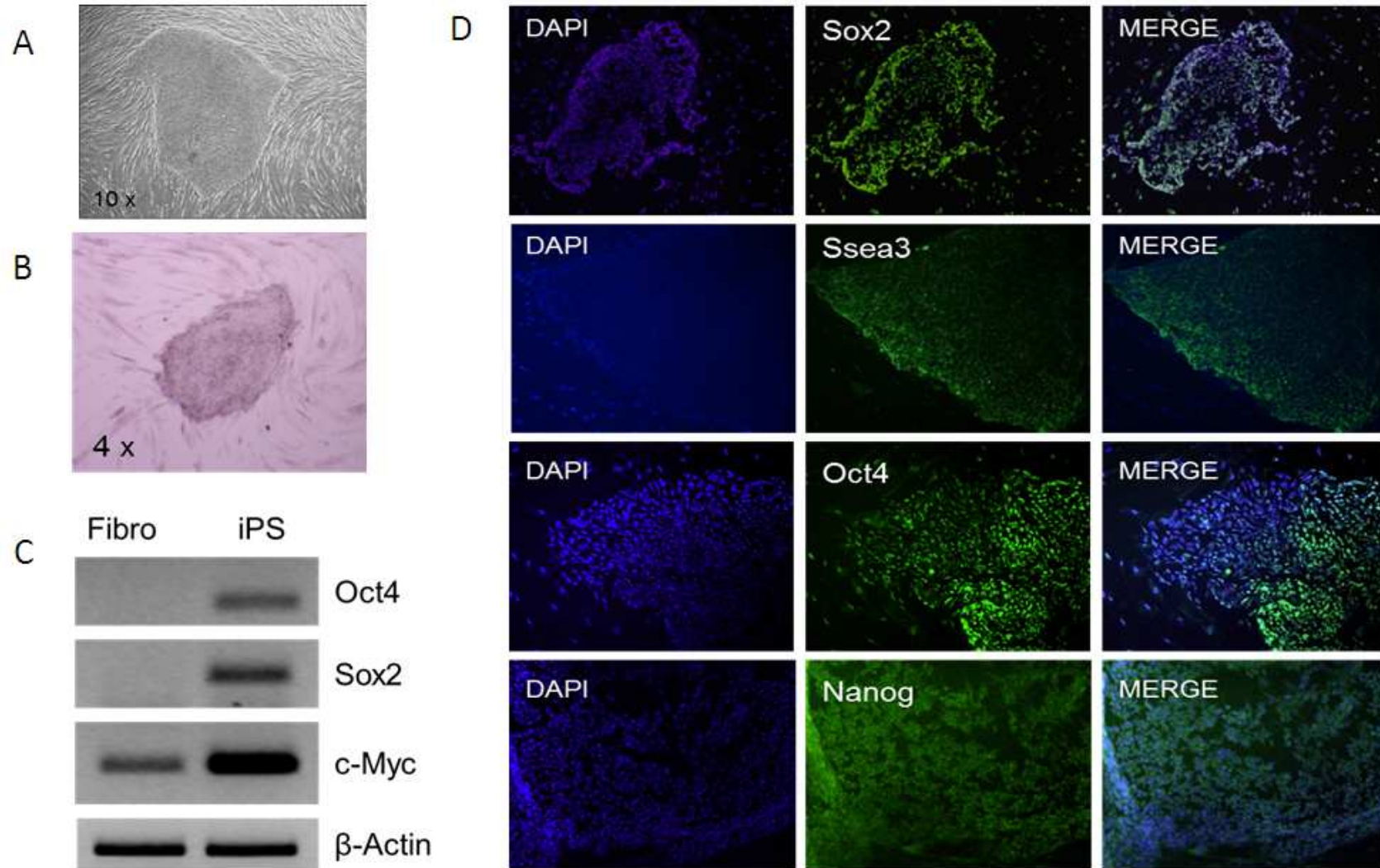
BRIEF REPORT

Safety and Efficacy of Gene Transfer for Leber's Congenital Amaurosis

Albert M. Maguire, M.D., Francesca Simonelli, M.D., Eric A. Pierce, M.D., Ph.D., Edward N. Pugh, Jr., Ph.D., **Federico Mingozzi, Ph.D.**, Jeannette Bennicelli, Ph.D.,

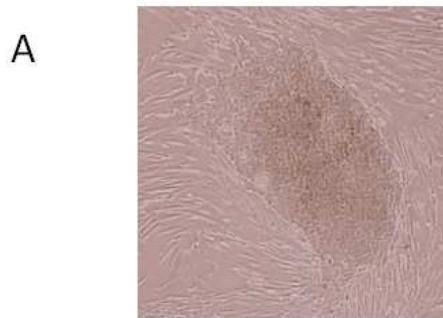
iPS CELLS

derivate da cellule somatiche (fibroblasti dermici)

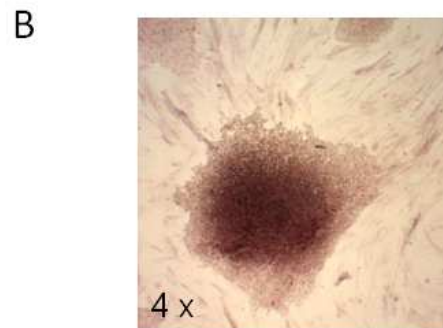


iPS CELLS

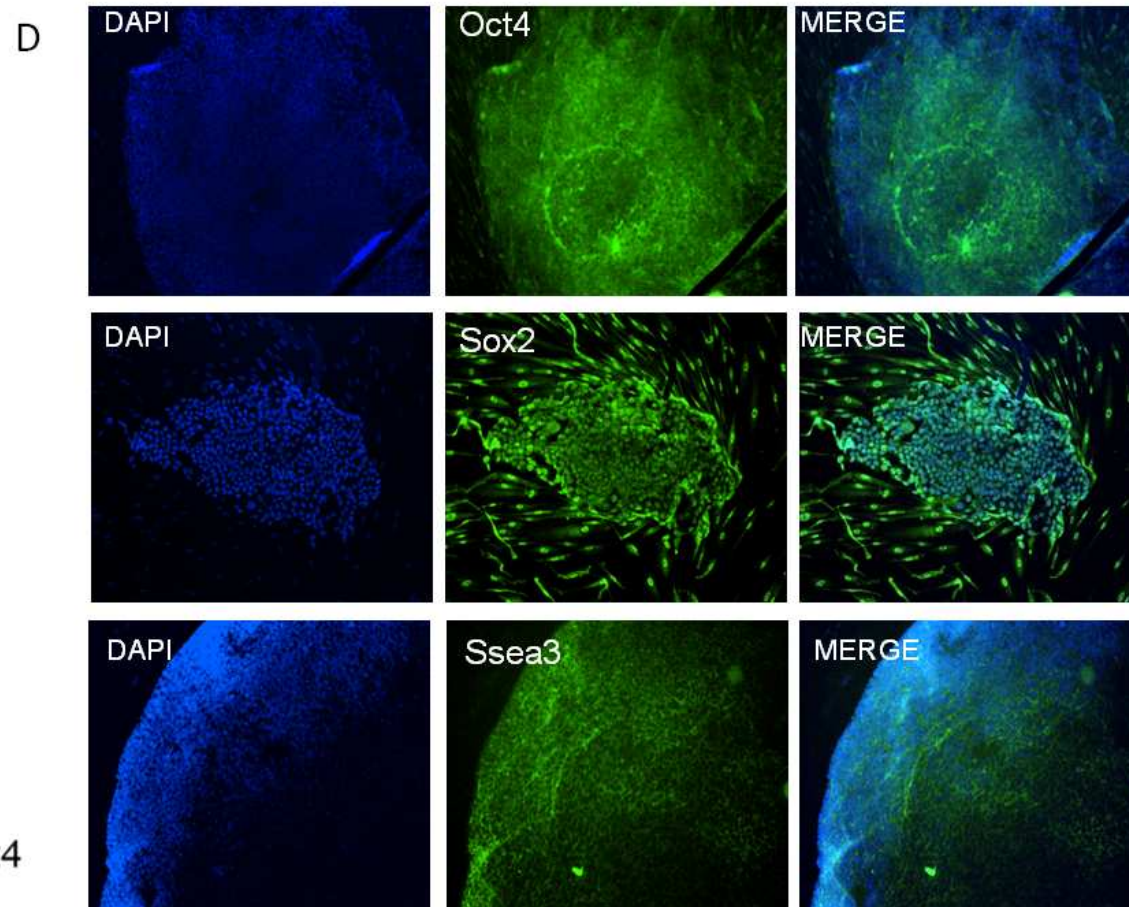
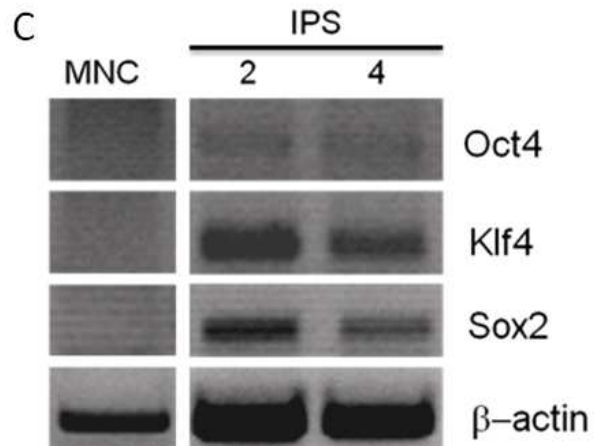
derivate da cellule somatiche (mononucleati ematici)



10 x

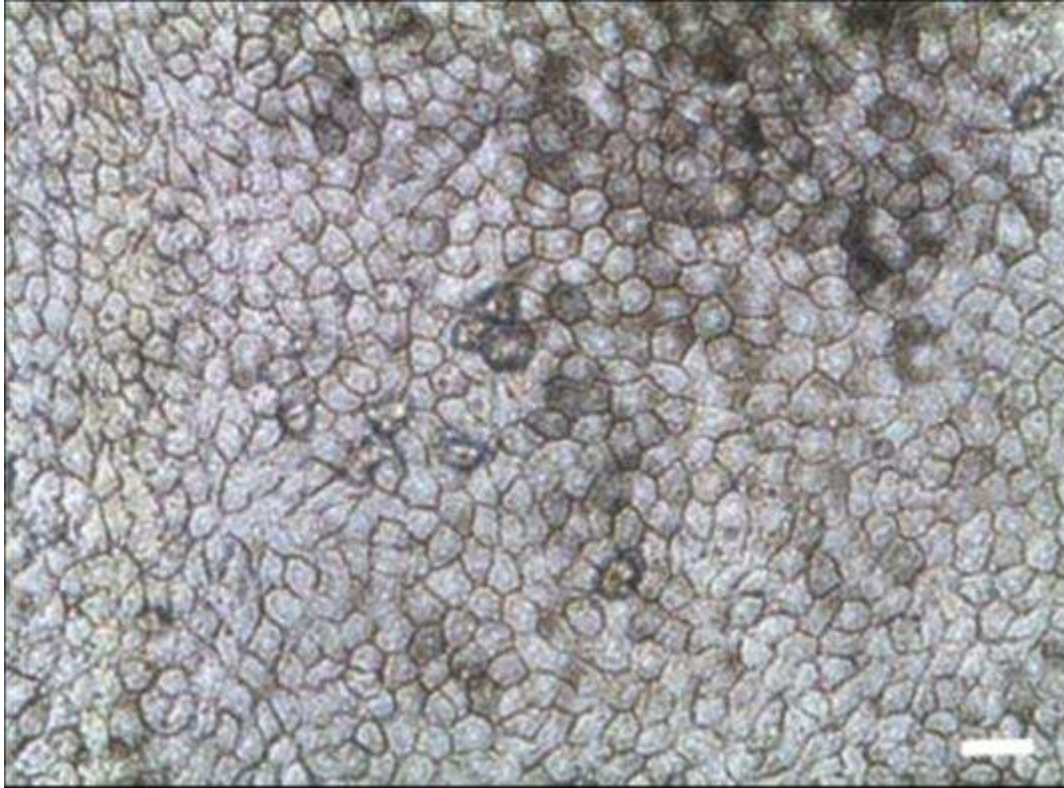


4 x



EPR (monostratificato)

derivato da cellule iPS



Mingozzi F. University of Pennsylvania - CHOP

**PRODUCENDO DIVERSI EPR
UTILIZZANDO**

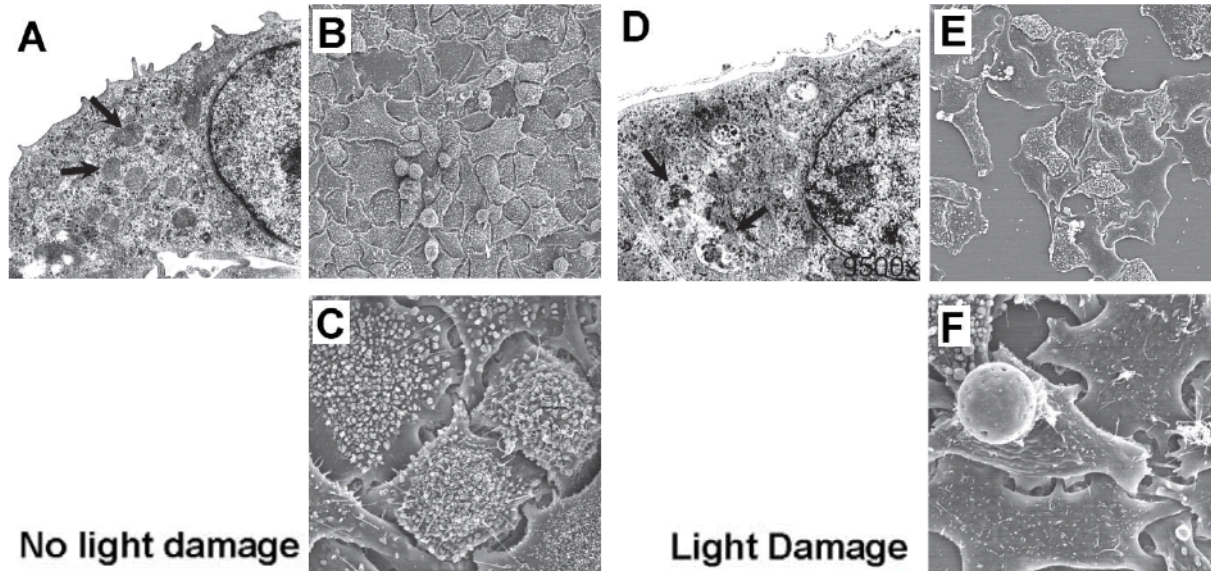
1. cellule iPS native di pazienti con DMLE e varianti geniche predisponenti (omozigosi)

2. stesse cellule iPS corrette geneticamente per ciascuna omozigosi correlata a DMLE

TESSUTI AUTOLOGHI EPR-1 ED EPRs-2

diversi solo per la correzione genica di una singola omozigosi predisponente alla DMLE

PROCEDURE STANDARDIZZATE DI FOTO-STRESS OSSIDATIVO



Kernt M et al. Clin Exp Ophthalmol. 2012

SEGUITE DA VALUTAZIONI COMPARATIVE *IN VITRO* PER VERIFICARE SE
NEGLI EPR GENETICAMENTE CORRETTI SIA PRESENTE UNA MINORE
SUSCETTIBILITÀ AL DANNO TESSUTALE RISPETTO AGLI EPR NATIVI



“PROOF OF CONCEPT” = RISULTATI ATTESI

RISULTATI ATTESI

➤ supportati da numerosi DATI INCROCIATI di "plausibilità" genetica e biomolecolare

PRINCIPALI SNPs ↔ DMLE

1. rs1061170 del gene CFH
2. rs403846 del gene CFH
3. rs10490924 del gene ARMS2
4. rs11200638 del gene HTRA1
5. rs2230199 del gene C3
6. rs641153 del gene CFB
7. rs4151667 del gene CFB
8. rs547154 del gene C2
9. rs9332739 del gene C2

Biochemistry and Molecular Biology

IOVS, August 2011, Vol. 52, No. 9

The Effect of Photo-oxidative Stress and Inflammatory Cytokine on **Complement Factor H** Expression in Retinal Pigment Epithelial Cells

Ling-Ing Lau,^{1,2,3} Shib-Hwa Cbiou,^{1,2,3} Catherine Jui-Ling Liu,^{2,3} May-Yung Yen,^{2,3} and Yau-Huei Wei^{1,4,5}

POTREBBERO RAPPRESENTARE QUEI MATTONI FONDAMENTALI PER LO SVILUPPO

TERAPIA GENICA DELLA DMLE



PREVENTIVA DELLE PIÙ COMUNI FORME INVALIDANTI DELLA MALATTIA

augurandosi che qualcosa di “bello agli occhi di tutti” possa davvero prendere forma



*GRAZIE
PER
L'ATTENZIONE*