



UNIVERSITY & RESEARCH
HOSPITALS

**PUNTO DI ASCOLTO TRA MALATI MIOTONICI,
MEDICI E RICERCATORI**

Aula Magna, IRCCS Policlinico San Donato
Piazza E. Malan, 1 – San Donato Milanese

Sabato 12 Novembre 2016

Principi di terapia genica

Dott.ssa Rosanna Cardani



I.R.C.C.S.
**POLICLINICO
SAN DONATO**



malattie genetiche multisistemiche a trasmissione autosomica dominante

**Distrofia miotonica tipo 1 (DM1) o
malattia di Steinert
1909**



- forme congenite, giovanili e adulte
- coinvolta la muscolatura facciale e distale
- compromissione cognitiva grave
- forma più grave

**Distrofia miotonica tipo 2 (DM2)
o PROMM
1994**



- forme adulte e giovanile
- coinvolta la muscolatura prossimale
- forma più lieve



Attualmente non esiste una terapia efficace per la cura delle distrofia miotoniche e la terapia si basa quindi sul trattamento dei diversi sintomi



CUORE Farmaci specifici per correggere il ritmo cardiaco; pacemaker cardiaco se indicato

PROBLEMI INTESTINALI Farmaci antispastici per il dolore

MIOTONIA Farmaci per ridurre il sintomo miotonico (mexiletina)

DIABETE modifica della dieta; farmaci quali insulina o insulino mimetici

CATARATTA rimozione chirurgica



I.R.C.C.S.
POLICLINICO
SAN DONATO

Terapia



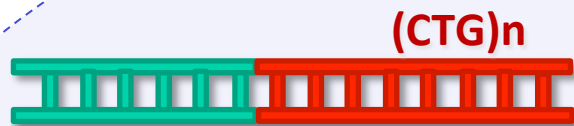
... tuttavia ...

Nel corso degli anni numerosi gruppi di ricerca si sono impegnati nella ricerca di potenziali farmaci per la cura delle distrofie miotoniche con risultati molto incoraggianti

Per poter trovare una terapia efficace per una malattia bisogna innanzitutto conoscerne il **meccanismo patogenetico**



Distrofia miotonica tipo 1 DM1



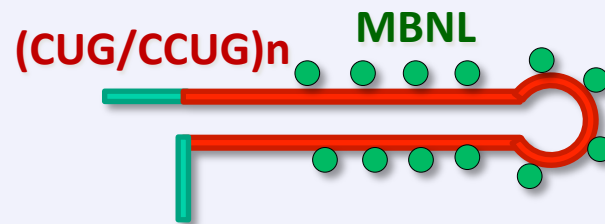
gene DMPK

Distrofia miotonica tipo 2 DM2

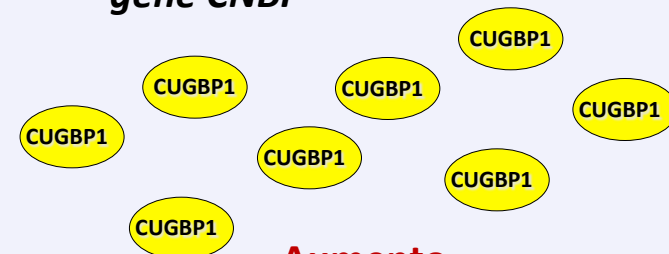


gene CNBP

Accumulo di RNA
tossico nel nucleo
delle cellule

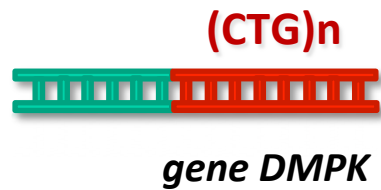


Sequestro delle proteine
Muscleblind

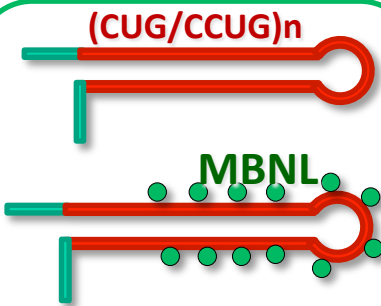


Aumento
dell'espressione della
proteina CUGBP1

alterazione della espressione di numerosi geni
spliceopatia-multisitemicità

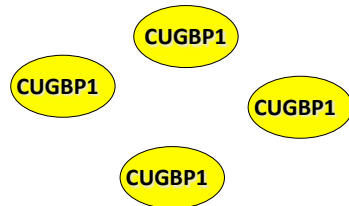


A livello del DNA e quindi della mutazione



A livello dell'RNA tossico (ribozimi, oligonucleotidi antisenso, morfolino)

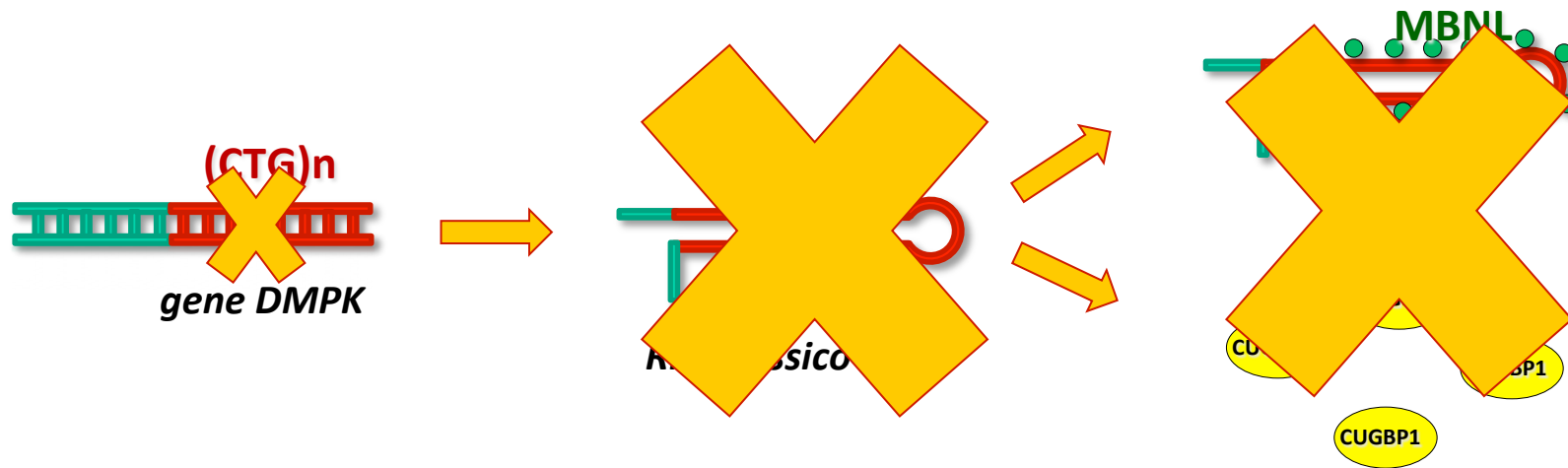
A livello del sequestro delle proteine sul RNA tossico



A livello delle proteine (overespressione di CUGBP1)



I.R.C.C.S.
POLICLINICO
SAN DONATO

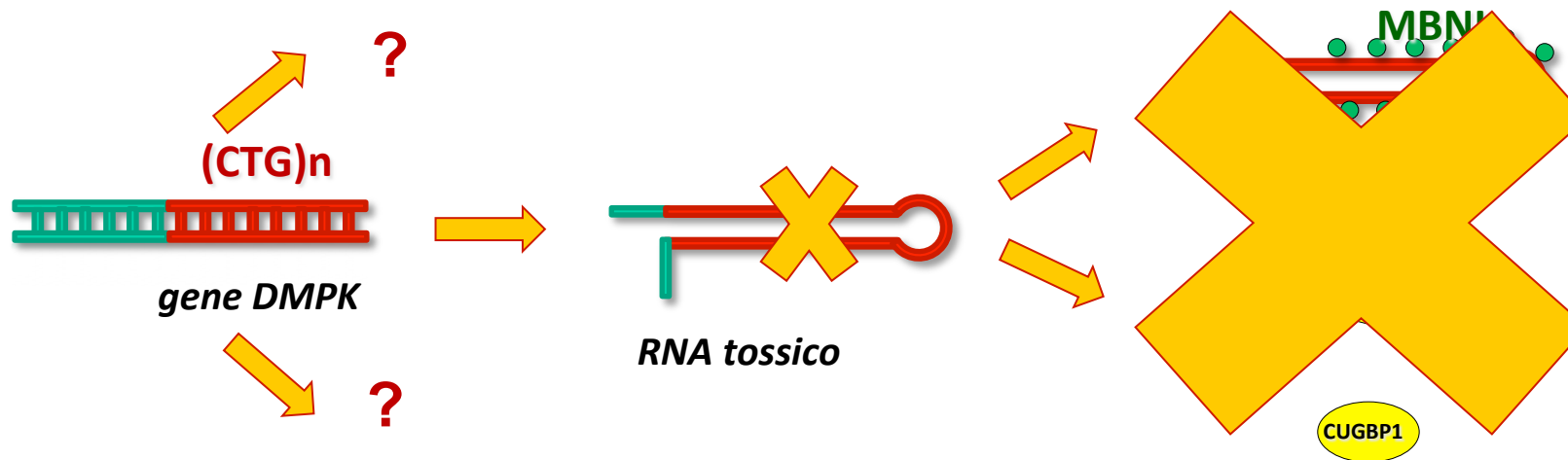


Facilità di intervento

Potenziale impatto terapeutico



I.R.C.C.S.
POLICLINICO
SAN DONATO

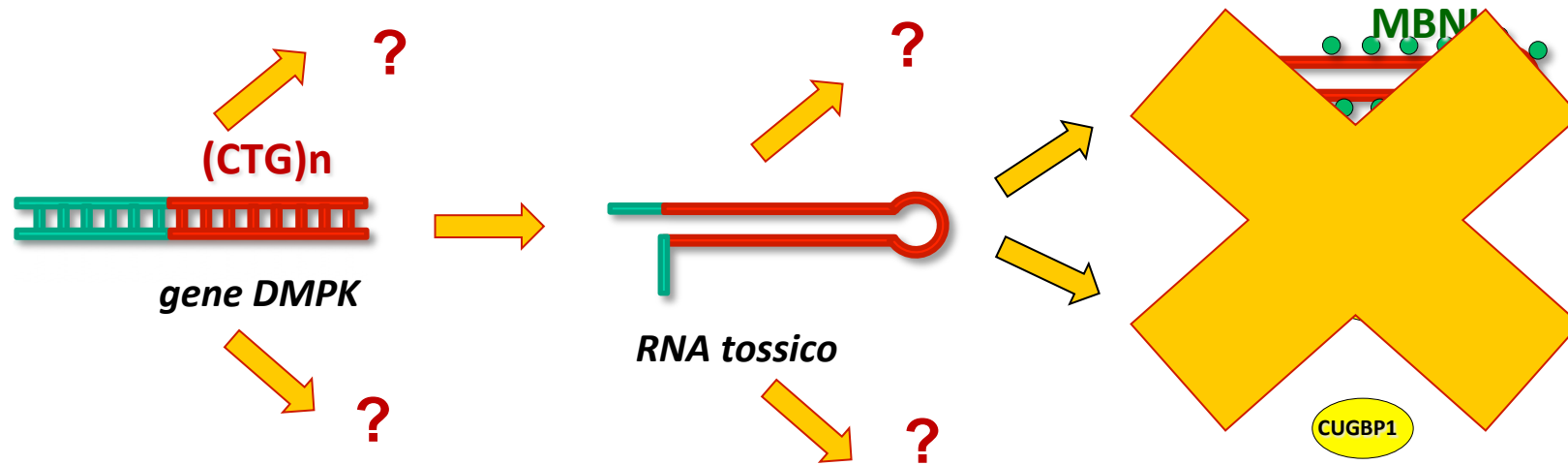


Facilità di intervento

Potenziale impatto terapeutico



I.R.C.C.S.
POLICLINICO
SAN DONATO



Facilità di intervento

Potenziale impatto terapeutico



I.R.C.C.S.
POLICLINICO
SAN DONATO

A livello del DNA

(CTG)_n



gene DMPK

A livello del DNA e quindi della mutazione

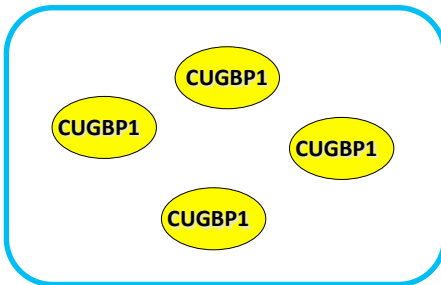
Ad oggi questa rimane solo una possibilità in quanto i meccanismi che portano alla formazione delle espansioni sono complessi e poco conosciuti



I.R.C.C.S.
POLICLINICO
SAN DONATO

Proteine

A livello delle proteine



A livello delle proteine (overespressione di CUGBP1)

CUGBP1 overexpression in mouse skeletal muscle reproduces features of myotonic dystrophy type 1

Amanda J. Ward^{1,2}, Mendell Rimer⁴, James M. Killian³, James J. Dowling⁵
and Thomas A. Cooper^{1,2,*}

¹Department of Pathology and Immunology, ²Department of Molecular and Cellular Biology and ³Department of Neurology, Baylor College of Medicine, Houston, TX 77030, USA, ⁴Department of Neuroscience and Experimental Therapeutics, Texas A&M Health Science Center College of Medicine, College Station, TX 77843, USA and ⁵Department of Pediatrics, University of Michigan Medical Center, Ann Arbor, MI 48109, USA

Heart-specific overexpression of CUGBP1 reproduces functional and molecular abnormalities of myotonic dystrophy type 1

Misha Koshelev^{1,†}, Satyam Sarma^{2,3,†}, Roger E. Price⁵, Xander H.T. Wehrens^{2,3}
and Thomas A. Cooper^{1,4,*}

¹Department of Pathology, ²Department of Molecular Physiology and Biophysics, ³Department of Medicine (Cardiology), ⁴Department of Molecular and Cellular Biology and ⁵Center for Comparative Medicine, Baylor College of Medicine, Houston, TX 77030, USA

PKC inhibition ameliorates the cardiac phenotype in a mouse model of myotonic dystrophy type 1

Guey-Shin Wang,¹ Muge N. Kuyumcu-Martinez,¹ Satyam Sarma,^{2,3} Nitin Mathur,^{2,3}
Xander H.T. Wehrens,^{2,3} and Thomas A. Cooper^{1,4}

¹Department of Pathology, ²Department of Molecular Physiology and Biophysics, ³Department of Medicine (Cardiology), and ⁴Department of Molecular and Cellular Biology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA.

Increased Steady-State Levels of CUGBP1 in Myotonic Dystrophy 1 Are Due to PKC-Mediated Hyperphosphorylation

N. Muge Kuyumcu-Martinez,¹ Guey-Shin Wang,¹ and Thomas A. Cooper^{1,2,*}

¹Department of Pathology

²Department of Molecular and Cellular Biology
Baylor College of Medicine, Houston, TX 77030, USA

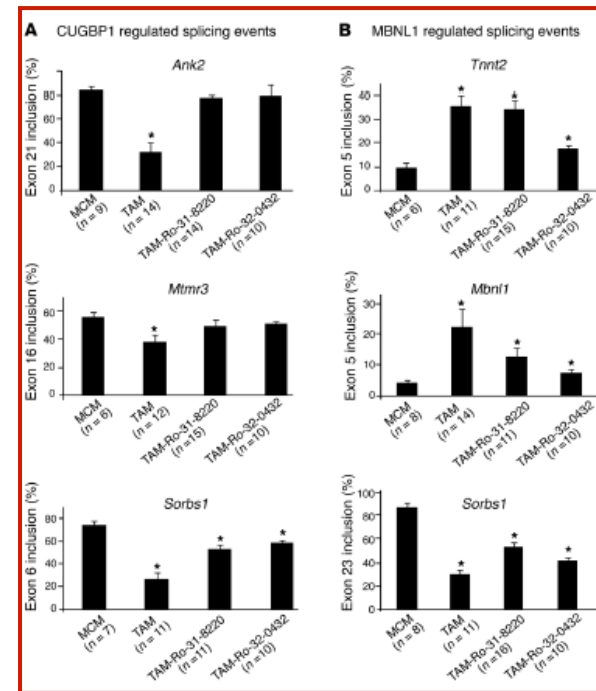
*Correspondence: tcooper@bcm.edu

DOI 10.1016/j.molcel.2007.07.027



E' stata studiata la riduzione della espressione di CUGBP1 in topi modello DM

Il trattamento dei topi con specifici inibitori ha portato ad un miglioramento della **conduzione e della contrattilità cardiaca** e il ripristino dell'espressione di diversi geni che sono sotto il controllo di CUGBP1

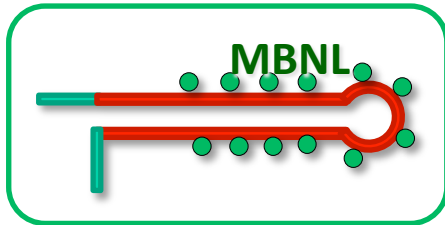


Agire a questo livello può portare dei benefici
ma teoricamente l'impatto terapeutico potrebbe essere troppo basso



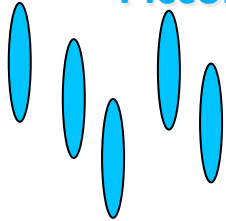
I.R.C.C.S.
POLICLINICO
SAN DONATO

A livello del RNA tossico

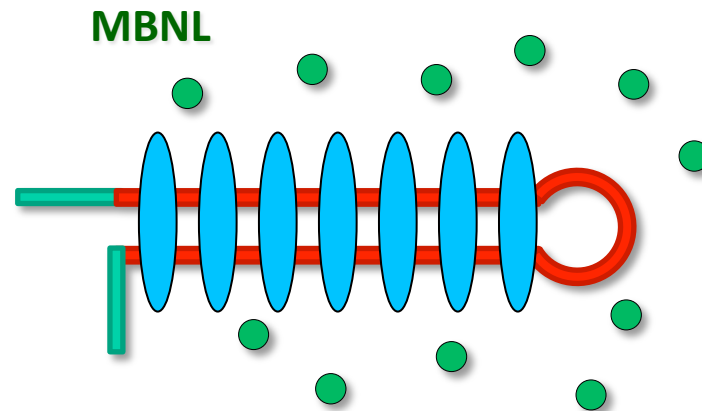


A livello del sequestro delle proteine MBNL

Piccole molecole



Le **piccole molecole** sono molecole di piccole dimensioni che si legano con alta affinità all'RNA tossico impedendo alle proteine di legarsi a loro volta





Rational design of ligands targeting triplet repeating transcripts that cause RNA dominant disease: Application to myotonic muscular dystrophy type 1 and spinocerebellar ataxia type 3

Alexei Pushechny
Jonathan M. Freese
† Department of Chemistry
University at Buffalo
NY 14260

Actinomycin D Specifically Reduces Expanded CUG Repeat RNA in Myotonic Dystrophy Models

Ruth B. Siboni,^{1,5} Masayuki Nakamori,^{2,5} Stacey D. Wagner,¹ Adam J. Struck,¹ Leslie A. Coonrod,¹ Shanee A. Harriott,³ Daniel M. Cass,³ Matthew K. Tanner,¹ and J. Andrew Berglund^{1,4,*}

Phenylbutazone induces expression of MBNL1 and suppresses formation of MBNL1-CCUG RNA myotonic

^a, Mikako Ito,
Toshihiro Ohno¹

Rationally Designed Small Molecules That Target the DNA and RNA Causing Myotonic Dystrophy

Lien Nguyen, Long M. Luu, Shaohong Peng, Julio F. Serrano, H. Y. Edwin Chiu
J. Am. Chem. Soc., Just Accepted Manuscript • DOI: 10.1021/jacs.5b09266 • Published online 19 October 2015
Downloaded from <http://pubs.acs.org> on October 19, 2015

Studying a Drug-like, RNA-Focused Small Molecule Library Identifies Compounds That Inhibit RNA Toxicity in Myotonic Dystrophy

Suzanne G. Rzuczek,[†] Mark R. Southern,[‡] and Matthew D. Disney^{*,†}

[†]Department of Chemistry and [‡]Translational Research Institute, The Scripps Research Institute, Scripps Florida, 130 Scripps Way #3A1, Jupiter, Florida 33458, United States

Small Molecules that Target the Toxic RNA in Myotonic Dystrophy Type 2

Lien Nguyen, JuYeon Lee

Structure of the Myotonic Dystrophy Type 2 RNA and Designed Small Molecules That Reduce Toxicity

Jessica L. Childs-Disney^{#a}, Ilyas Yildirim^{#b}, HaJeung Park^{a,c}, Jeremy R. Lohman^a, Lirui Guan^a, Tuan Tran^a, Partha Sarkar^d, George C. Schatz^b, and Matthew D. Disney^{a,*}

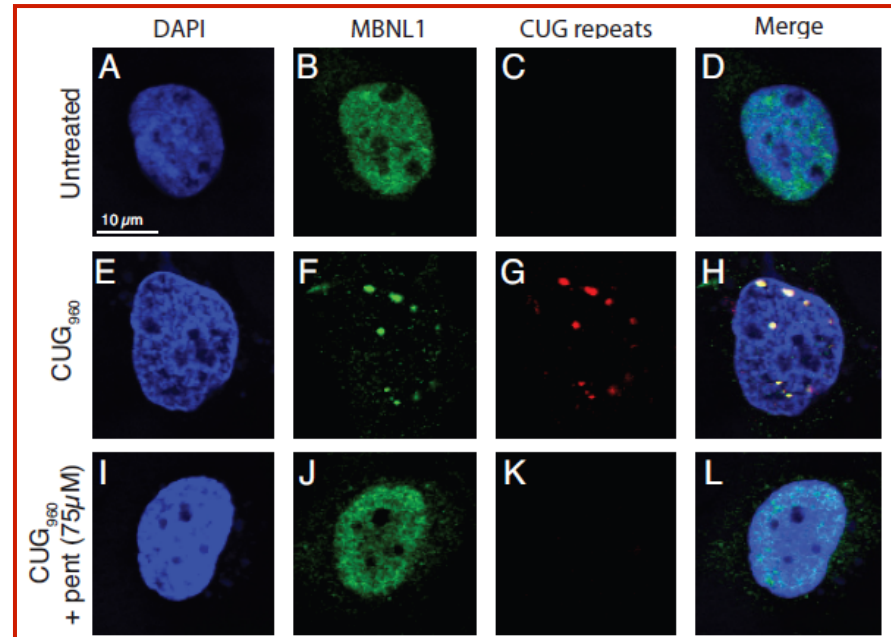
Selective inhibition of MBNL1-CCUG interaction by small molecules toward potential therapeutic agents for myotonic dystrophy type 2 (DM2)[†]

Prasanna Rao Ramisetty, Anne M. Baranger* and



Le piccole molecole:

- Riducono il sequestro delle proteine MBNL
- Ripristinano l'espressione di diversi geni (es canale del cloro)
- Migliorano la morfologia del muscolo scheletrico



Kanamicina – Pentamidina - Eptamidina

sono per lo più molecole già utilizzate in campo farmaceutico per la cura di altre malattie (es. antibiotici)

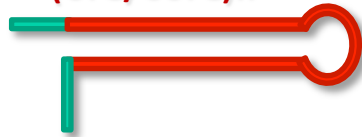
Tuttavia gli studi effettuati su cellule e su topi hanno però evidenziato che queste molecole sono citotossiche alle dosi a cui andrebbero usate per le DM e quindi il loro utilizzo è molto rischioso



I.R.C.C.S.
POLICLINICO
SAN DONATO

A livello del RNA tossico

(CTG/CCTG)_n

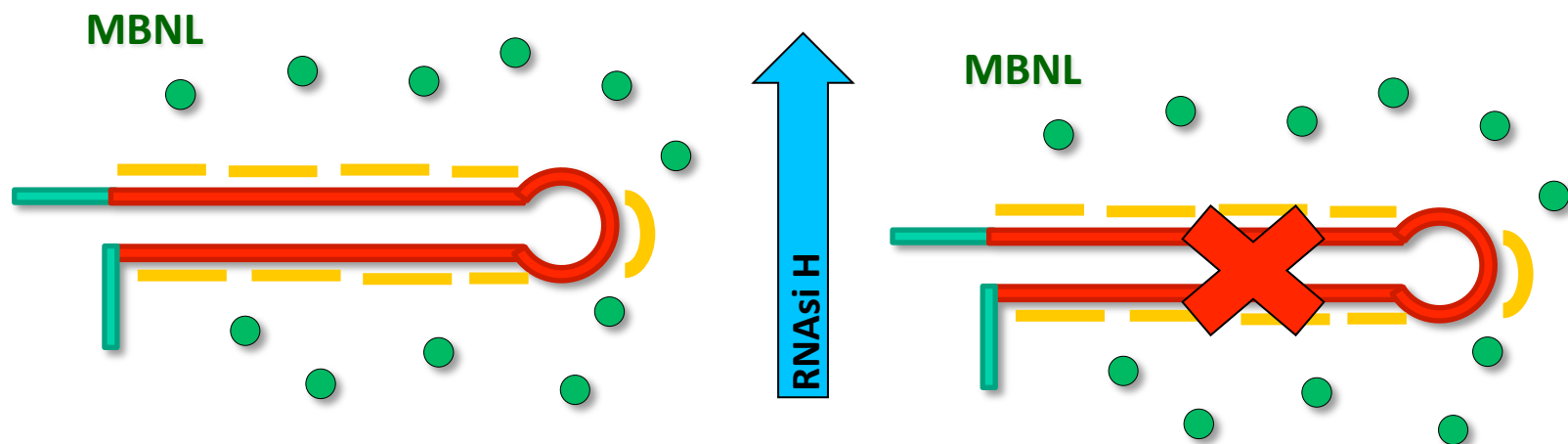


A livello dell'RNA tossico (ribozimi, oligonucleotidi antisenso, morfolino)

Oligonucleotide
antisenso



Gli **oligonucleotidi antisenso** sono piccole molecole di RNA a singolo filamento complementari alla sequenza del RNA tossico





Ultrasound-enhanced delivery of
Morpholino with Bubble liposomes
ameliorates the myotonia of
dystrophy model mice

Michinori Koebis¹, Tamami Kiyatake¹, Hiroshi Yamaura¹, Kanako Nagano¹,
Masahiro Sonoo³, Yukiko Hayashi⁴, Yoichi Negishi⁵, Yoko Endo-Takahashi¹,
Ryoichi Matsuda¹, Masanori P. Takahashi⁶, Ichizo Nishino⁴ & Shoichi Ishii¹

**RNase H-mediated degradation of toxic RNA
in myotonic dystrophy type 1**

Johanna E. Lee^{a,b}, C. Frank Bennett^c, and Thomas A. Cooper^{a,b,d,1}

**Reversal of RNA-dominance by displacement of protein
sequestered on triplet repeat RNA**

Thurman M. Wheeler¹, Krzysztof Sobczak¹, John D. Lueck², Robert J. Osborne¹, Xiaoyan
Lin¹, Robert T. Dirksen², and Charles A. Thornton^{1,3}

Triplet-repeat oligonucleotide-m
of
Susar
Petra
Char

**Correction of CIC-1 splicing eliminates
chloride channelopathy and myotonia
in mouse models of myotonic dystrophy**

Thurman M. Wheeler,¹ John D. Lueck,² Maurice S. Swanson,³
Robert T. Dirksen,² and Charles A. Thornton¹

¹Department of Neurology and ²Department of Pharmacology and Physiology, University of Rochester, Rochester, New York, USA.
³Department of Molecular Genetics and Microbiology, Genetics Institute, University of Florida, Gainesville, Florida, USA.

ster, Rochester, NY 14642

University of Rochester, Rochester, NY 14642

Modified Antisense

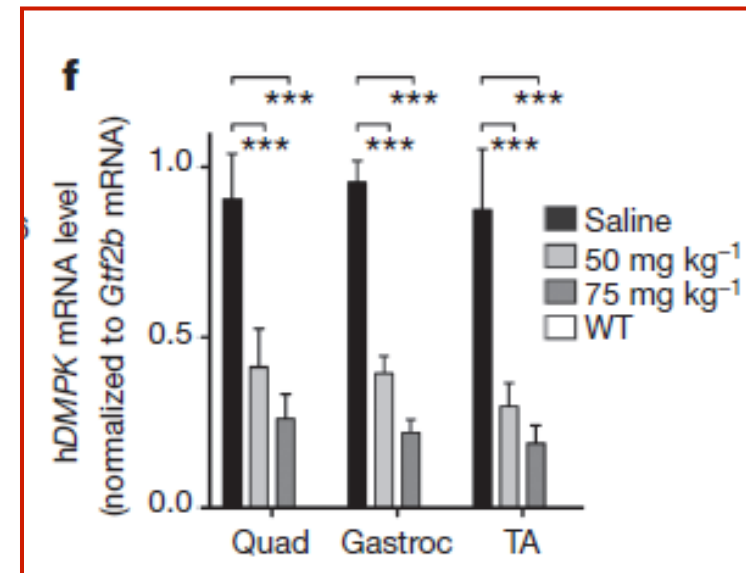
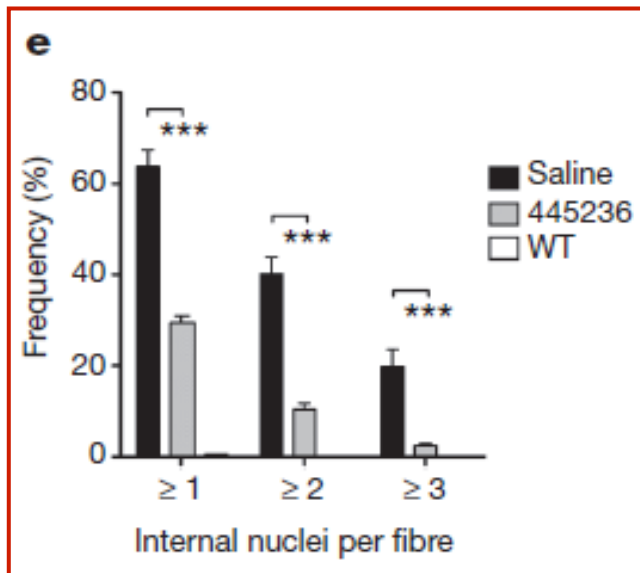
and Nonhuman Primates

for the Treatment of Myotonic Dystrophy Type 1



Gli oligonucleotidi antisenso:

- Riducono i livelli di RNA tossico
- Riducono il sequestro delle proteine MBNL
- Ripristinano l'espressione di diversi geni (es canale del cloro)
- Migliorano la morfologia del muscolo scheletrico





IONIS-DMPK2,5_{RX}: studi preclinici

- **studi *in vitro* su cellule:** una riduzione di mRNA tossico nelle cellule



- **modello di topo DM1:** significativa riduzione di mRNA tossico nelle cellule muscolari



riduzione dei sintomi (miotonia) fino ad un anno dopo il trattamento



- **primati non umani:** significativa riduzione di mRNA tossico nelle cellule muscolari che persiste fino a 3 mesi dopo il trattamento





I.R.C.C.S.
POLICLINICO
SAN DONATO

Il Trial clinico



**2014: INIZIO DEL TRIAL CLINICO PER LA
DISTROFIA MIOTONICA DI TIPO 1**



I.R.C.C.S.
POLICLINICO
SAN DONATO

RINGRAZIAMENTI

medici



biologi

Dott.ssa Barbara Fossati

Dott. ssa Elisa Brigonzi

Dott. Michele Cavalli

Dott. Giovanni Arpa

Dott.ssa Rosanna Cardani

Dott.ssa Laura V Renna

Dott.ssa Francesca Bosè

Dott.ssa Elena Canali

Dott. Nicola Ferrari

Dott. Andrea
Marchesi
Infermiera
Roberta Milesi

.....gli altri i componenti
del gruppo del Prof. Meola

