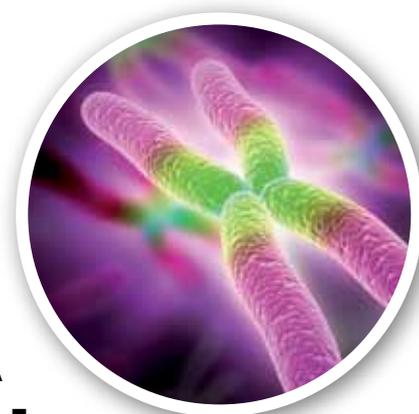
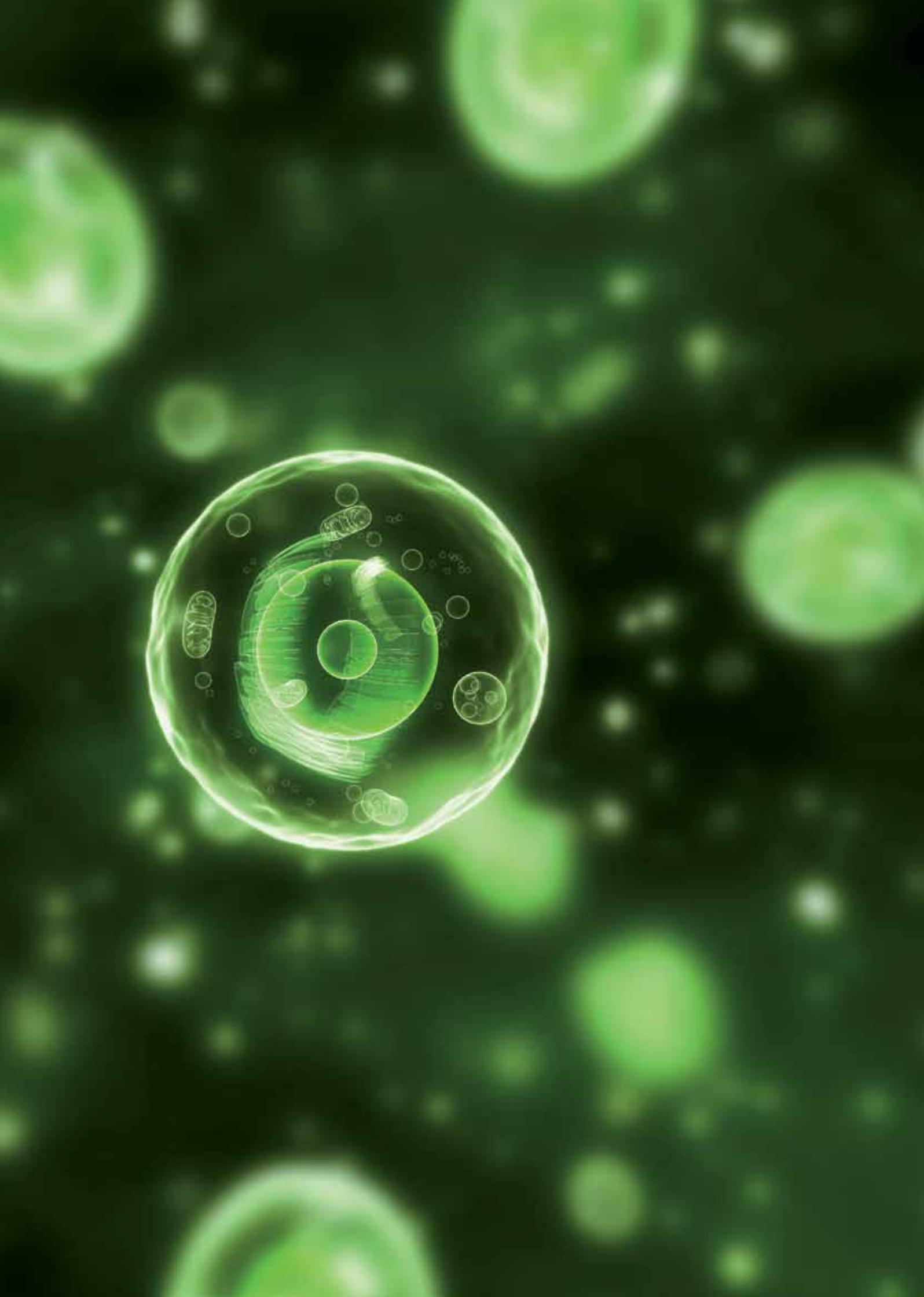


Guida alla ricerca sulla SMA Atrofia Muscolare Spinale





1 Che cos'è l'atrofia muscolare spinale?

L'atrofia muscolare spinale (o SMA dall'acronimo inglese Spinal Muscular Atrophy) è una patologia neuromuscolare genetica, autosomica recessiva, indicata spesso col nome di malattia del motoneurone.

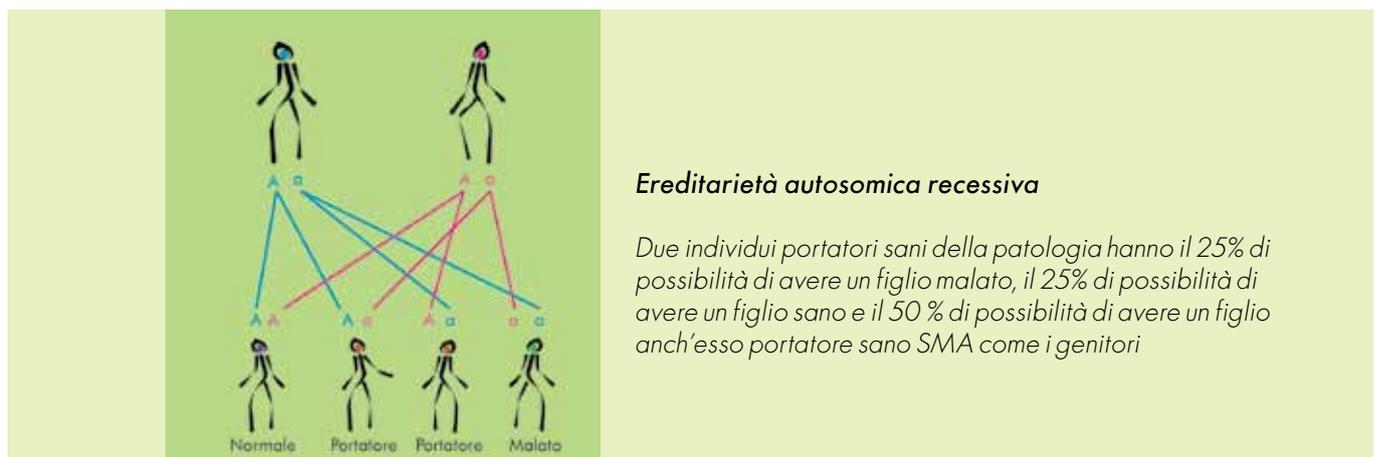
La SMA è una malattia genetica

Genetica significa che è correlata ai nostri geni. Ciascuno di noi possiede un corredo di circa 30.000 geni, che ereditiamo dai nostri genitori.

Questi geni sono responsabili della maggior parte delle nostre caratteristiche personali. Nella SMA si verifica la mutazione di un gene responsabile della produzione di una proteina necessaria per il corretto funzionamento delle cellule, in particolare di quelle nervose chiamate motoneuroni.

I ricercatori possiedono la mappa di tutti i geni del nostro corpo e sono riusciti a mettere in relazione la SMA con un gene situato nel nostro cromosoma 5 chiamato "Survival MotorNeuron gene" (SMN1).

L'assenza o l'alterazione di questo gene causa la SMA, che attualmente rappresenta la prima causa di morte per malattia genetica nell'età infantile.



La SMA è una patologia autosomica recessiva

Il termine autosomica recessiva si riferisce al modo con cui la patologia è ereditata dai genitori ai figli.

Nella SMA le persone affette hanno ereditato due copie alterate del gene in questione, una per ciascun genitore. I genitori possiedono dunque una copia normale ed una difettosa del gene: sono portatori del difetto genetico ma non presentano le caratteristiche della malattia in quanto una delle copie del gene è intatta.

La SMA è una malattia del motoneurone

Il neurone è una cellula nervosa che riceve e trasmette messaggi da e verso le nostre parti del corpo. I motoneuroni sono un tipo particolare di neuroni e sono responsabili della trasmissione degli impulsi nervosi all'apparato muscolare. In altri termini ci consentono tutti i movimenti del corpo. Nella SMA queste cellule non possiedono una quantità sufficiente della proteina SMN per cui degenerano e muoiono, portando ad una spiccata debolezza muscolare ed atrofia.

Tutte le forme colpiscono i muscoli scheletrici del tronco e degli arti; in generale i muscoli più vicini al centro del corpo sono i più colpiti rispetto a quelli più distali. Anche i muscoli respiratori sono coinvolti in misura variabile.

La SMA è una malattia neuromuscolare

Le malattie neuromuscolari coinvolgono il sistema nervoso periferico, che include il corpo cellulare dei motoneuroni (localizzato nel midollo spinale), gli assoni dei motoneuroni (un loro prolungamento che raggiunge le diverse parti del corpo), le giunzioni neuromuscolari (le connessioni tra nervi e muscoli) e gli stessi muscoli.

Il sistema nervoso centrale è formato dal cervello e dal midollo spinale. Il compito del sistema nervoso periferico è quello di trasmettere le informazioni che intercorrono tra il sistema nervoso centrale e il resto del nostro corpo.



Quali sono le differenti forme della patologia?

L'età di esordio della malattia e la severità dei sintomi clinici sono molto variabili e sono alla base della classificazione delle differenti forme. Se ne distinguono tre principali:

- la forma grave o malattia di Werdnig-Hoffmann (SMA I) caratterizzata dall'impossibilità dei bambini affetti di assumere la posizione seduta senza aiuto;
- la forma intermedia o SMA II nella quale è possibile la posizione seduta ma non il cammino;
- la forma lieve o malattia di Kugelberg-Welander (SMA III) che permette invece la stazione eretta non assistita.

Oltre a queste tre forme principali, sono descritte in letteratura la SMA0 i cui sintomi sono già presenti nel feto e la SMA4 o forma adulta, con età d'esordio molto variabile ma compresa tra i 20 e i 30 anni.

2 La ricerca

Quali sono gli obiettivi della ricerca sulla SMA?

Il principale obiettivo della ricerca sulla SMA è quello di accelerare la scoperta di trattamenti efficaci e di una cura per la SMA, con un triplice approccio:

- ricerca scientifica di base per acquisire nuove conoscenze sulle cause e fattori che influenzano il decorso della SMA ai livelli più basilari della vita, nei geni e nel DNA, nelle proteine, e nelle cellule del corpo;
- ricerca traslazionale per sviluppare e testare materiali chimici o biologici in modelli animali della malattia per verificare se possano costituire una terapia per la SMA;
- trial clinici per studiare e testare nuovi trattamenti su soggetti umani.

Obiettivo secondario della ricerca è la prevenzione della malattia.

Cosa si intende per trattamento?

Un trattamento per la SMA potrebbe agire in diverse maniere. Primo potrebbe rallentare la progressione o lo sviluppo della malattia.

Secondo potrebbe fermare la progressione della malattia. Per definizione un trattamento agisce fintanto che esso viene somministrato al paziente. Non mette fine alla malattia né significa che il paziente sia libero dalla malattia.

Cosa si intende per cura?

Cura significa che il paziente guarisce dalla malattia ed è capace di agire come chiunque altro non sia affetto dalla SMA. Una cura può invertire gli effetti della malattia.

Cosa si intende per prevenzione?

La prevenzione è un modo per evitare la comparsa di una malattia.

Mentre un trattamento è applicato dopo l'insorgenza della malattia, la prevenzione o una misura preventiva è utilizzata prima. Cioè previene la malattia all'origine.

Quali sono le aree chiave della ricerca sulla SMA?

La ricerca di base

La ricerca scientifica di base studia i costituenti fondamentali della vita, quali le molecole, le proteine, le cellule e i geni. Spesso definita anche ricerca di laboratorio, la ricerca di base coinvolge scienziati e ricercatori nei laboratori di tutto il mondo, alle prese con microscopi e capsule di Petri.

Altri tipi di ricerca scientifica, come quella traslazionale e quella clinica, si basano sulle scoperte e sugli indizi forniti dalla ricerca di base.

La ricerca di base riveste un ruolo fondamentale nella scoperta e nella sperimentazione di sostanze chimiche e biologiche con le potenzialità di diventare farmaci e terapie contro la SMA, nonché nell'identificazione di medicinali già esistenti con possibili applicazioni nella SMA. In questo stadio la ricerca è condotta su proteine, cellule e animali, non sull'uomo. Domande fondamentali sulla biologia della SMA, incluso l'esatto meccanismo che causa la malattia, devono trovare un'adeguata risposta attraverso la ricerca di base.

Ciò fornirà ai ricercatori materiale utile e nuove idee per la ricerca avanzata.

La ricerca farmacologica e traslazionale

La ricerca farmacologica sperimenta sostanze chimiche e biologiche, cercando una loro possibile applicazione terapeutica. In questa fase della ricerca possono venire studiati farmaci già in uso per differenti patologie, testandoli anche sulla SMA, oppure nuovi composti, pensati proprio per l'uso specifico nella SMA. La ricerca traslazionale applica conoscenze ottenute da un'area della ricerca in un'altra area: per esempio le nuove scoperte della ricerca di base applicate alla ricerca farmacologica. In sostanza i ricercatori traducono conoscenze di laboratorio in farmaci e terapie da sperimentare nei trial clinici su soggetti umani.

La ricerca clinica

La ricerca clinica è finalizzata al paziente, condotta su soggetti umani e su tessuti prelevati da esseri umani. Il ricercatore interagisce direttamente con i soggetti interessati all'interno del progetto di ricerca. La ricerca finalizzata al paziente può studiare a) i meccanismi alla base delle patologie umane, b) interventi terapeutici (usati per trattare le malattie), c) i trial clinici e d) lo sviluppo di nuove tecnologie.

3 I ricercatori



Quanti sono i ricercatori che si occupano di SMA?

Si stima che vi siano 300-400 soggetti in possesso di una laurea o di un dottorato di ricerca che sono coinvolti nella ricerca scientifica sulla SMA negli Stati Uniti e circa 600 in tutto il mondo.

Chi sono e dove lavorano i ricercatori che si occupano di SMA?

I ricercatori lavorano nei laboratori presso le università e i centri clinici, nelle aziende bio- tecnologiche farmacologiche. La ricerca sulla SMA è svolta da soggetti con una laurea o un dottorato di ricerca, o che stanno lavorando per ottenerlo, spesso nel campo della genetica, neurobiologia, biochimica e biologia cellulare. I laureati sono dottori in medicina che hanno frequentato l'università, poi la scuola di specializzazione in medicina. I dottori di ricerca dopo l'università frequentano i laboratori portando avanti un progetto di 3-4 anni.

4 La ricerca di base

Quali sono le domande più frequenti alla base della ricerca?

Le domande alla base della ricerca definiscono i misteri insoluti sulla SMA e ciò che causa la patologia. Ogni progetto di ricerca implica una o più domande, alcune delle quali sono:

Qual'è il ruolo della proteina SMN nella causa della SMA?

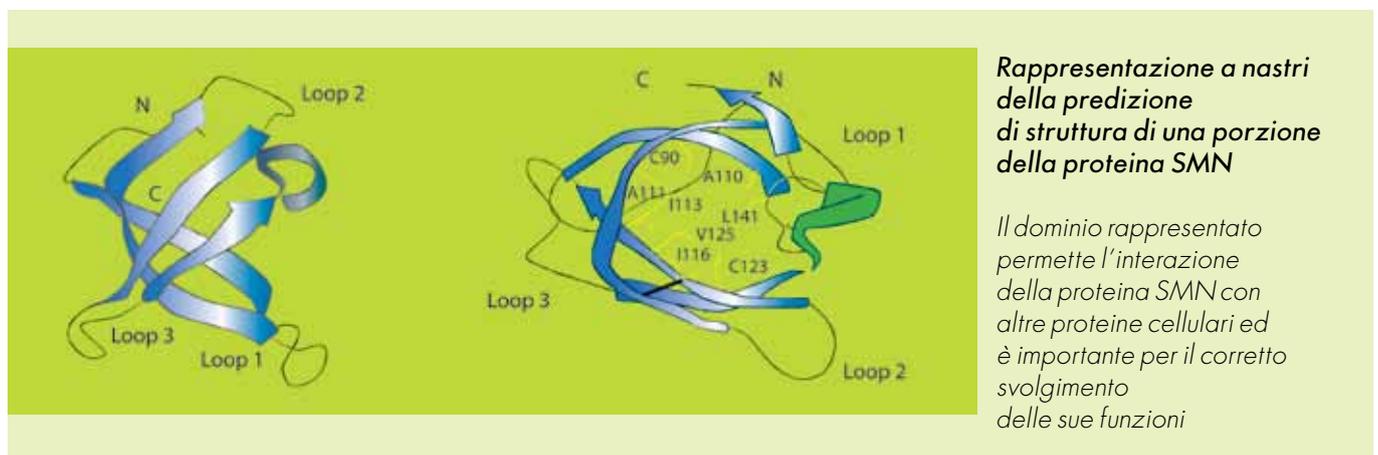
La proteina SMN ha numerose funzioni. Non è ancora ben chiaro quale di queste sia la più importante all'origine della SMA. Inoltre non si comprende con esattezza il ruolo della proteina SMN in condizioni di non patologia. Non è chiaro cioè perché e come la mancanza della proteina SMN porti alla degenerazione e morte dei motoneuroni.

La SMA è soltanto una malattia del motoneurone?

Non si sa ancora se le persone affette da SMA abbiano problemi in altre aree del corpo come ossa e muscoli. Nella SMA è coinvolto soprattutto un particolare tipo di cellula nervosa, il motoneurone. Recenti studi hanno mostrato che la sostituzione della SMN specificamente nel sistema nervoso può prevenire la maggior parte dei sintomi della SMA. Tuttavia ci sono dei problemi in altri organi del corpo che possono essere causati direttamente o indirettamente dalla mancanza della proteina SMN.

Da cosa è controllata ed influenzata la proteina SMN?

Non si conosce molto dei meccanismi di regolazione della proteina SMN; cioè cosa ne influenza la sua funzione nel corpo umano. Potrebbero esserci molecole chimiche o enzimi che attivano o inibiscono la proteina o ne indirizzano l'attività. Attualmente l'obiettivo più importante della ricerca è trovare modi di identificare le molecole che regolano la funzione di SMN; ciò potrebbe portare alla scoperta di nuove tecniche per la produzione di farmaci per la SMA.



5 La ricerca farmacologica

Qual'è il processo di individuazione e sviluppo di un farmaco?

L'obiettivo della ricerca farmacologica nell'ambito della SMA e del processo di sviluppo degli stessi è quello di trovare una nuova molecola chimica o un farmaco esistente che funga da trattamento efficace o da cura per la SMA. La ricerca dei farmaci include numerose fasi. Una molecola candidata ad essere un farmaco deve superare ciascun stadio prima di passare al successivo.

La fase di scoperta dei farmaci è quella in cui i farmaci vengono scoperti e progettati. In questa fase le molecole chimiche vengono testate per rilevare il migliore tra i candidati farmaci per la SMA. Una volta che una molecola supera i primi test, va avanti verso i successivi stadi di sviluppo del farmaco. La scoperta dei farmaci include: 1) l'identificazione di molecole chimiche che potrebbero agire potenzialmente come farmaci per la SMA; 2) la modificazione di queste molecole chimiche in farmaci; 3) gli studi preliminari sugli animali per i composti di nuova identificazione. La chimica medicinale si occupa di creare versioni differenti di un composto, ciascuna con proprietà farmacologiche migliorate.

I ricercatori normalmente testano migliaia di composti chimici per trovare un candidato che possa potenzialmente agire come farmaco per la SMA. Attualmente gli sforzi maggiori nella ricerca di nuovi farmaci per la SMA si focalizzano sull'identificazione di composti che possano aumentare la quantità ridotta di proteina SMN prodotta dal gene di backup SMN2. Altri progetti si focalizzano su composti neuroprotettivi che in generale prevencono la morte dei motoneuroni. La ricerca sui farmaci cerca di rispondere alle seguenti domande:

- la molecola chimica può raggiungere una concentrazione sufficientemente elevata per poter essere attiva nel corpo umano?
- può attraversare la barriera emato-encefalica per raggiungere il sistema nervoso centrale e lì essere efficace?
- può essere somministrata in forma di pillola, iniezione o altra forma accettabile?

La ricerca di un farmaco è un processo ad alto rischio. In media circa il 90% dei potenziali farmaci neurologici fallisce nel superamento di tutte le fasi dei trial clinici necessari per l'approvazione da parte delle competenti autorità. Ecco le fasi della ricerca:

1. Identificazione dell'obiettivo. I ricercatori cercano di identificare gli obiettivi per la SMA. Gli obiettivi sono quindi utilizzati nelle fasi 2 e 3. Nel caso della SMA un esempio di obiettivo è il gene SMN2. I ricercatori vogliono trovare una molecola chimica che renda il gene SMN2 più attivo nella produzione della proteina.
2. Sviluppo di saggi per testare le molecole. Un saggio è un test utilizzato per vagliare diverse molecole e composti chimici, verificando se sono efficaci nell'attivare il target; per esempio attivare il gene SMN2.
3. Test sui composti chimici per trovare i cosiddetti "hit". I composti che superano i test di controllo sono chiamati "hit".
4. Test del "hit" per la bio-attività. Gli "hit" vanno incontro a ulteriori controlli (su capsule di Petri) per vedere se possiedono proprietà bioattive. Questo significa considerare se abbiano le potenzialità per agire su organismi viventi e tessuti.
5. Ottimizzazione del "hit". I ricercatori creano molecole chimiche correlate al "hit" migliore per verificare se possiedono delle caratteristiche migliori. Questo aiuta i ricercatori a trovare il composto con la massima bio-attività, le migliori qualità farmacologiche e il miglior profilo di sicurezza.
6. Studi di sicurezza sul "hit" migliore. Il migliore hit diviene un "candidato clinico" cioè un possibile farmaco. Il farmaco attraversa una serie di studi di sicurezza sugli animali. Se il candidato supera gli studi di sicurezza va alla fase di autorizzazione alla sperimentazione umana.

Quanto dura il processo di ricerca di un farmaco?

Per un farmaco l'intero processo di sviluppo e approvazione per il commercio può durare 10-15 anni. Il tempo richiesto per tutte le tre fasi dei trial clinici sull'uomo può durare 5-8 anni.

Stadio di scoperta del farmaco

Questa fase include un lavoro sperimentale pre-clinico. Durata: 5-8 anni.

Stadio autorizzativo alla sperimentazione umana

Questo stadio è per i farmaci che si sono rivelati promettenti per il trattamento della SMA. Se autorizzati dalle competenti autorità, i farmaci possono essere impiegati nella sperimentazione sull'uomo.

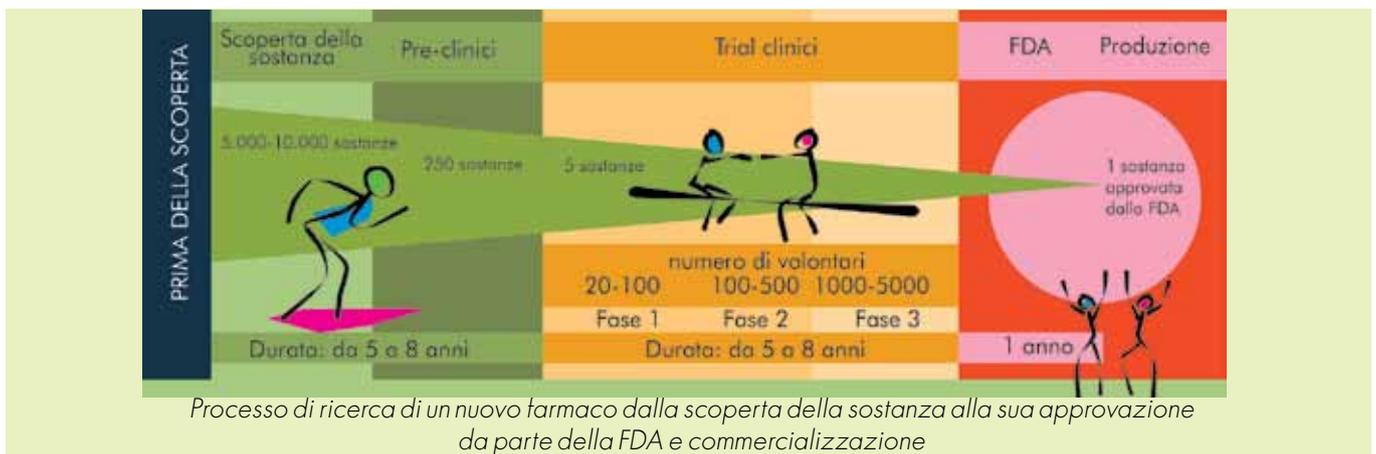
Durata: 6 mesi.

Stadio sperimentativo (trial clinici)

Fase I: studi di sicurezza Fase II: studi di efficacia Fase III: studi di beneficio (9 farmaci su 10 sono eliminati in queste fasi). Durata: 5-8 anni.

Stadio autorizzativo alla commercializzazione

Dopo questa fase il farmaco viene immesso sul mercato ed è disponibile al pubblico. Durata: 6 mesi – 1 anno.



Qual'è lo stadio autorizzativo alla sperimentazione umana?

Questo è uno stadio molto specifico del processo di sviluppo di un farmaco che richiede incontri con le autorità competenti (FDA negli Stati Uniti). È parte del processo di approvazione del farmaco che rende accessibili i trial clinici sull'uomo. Portare un farmaco a questo stadio è considerato una conquista; significa che un composto chimico si è rivelato applicabile come terapia e può essere trasformato in un farmaco per l'utilizzo umano. Una volta concessa l'autorizzazione (IND negli Stati Uniti) possono iniziare i trial clinici sull'uomo.

Cos'è lo stadio dei trial clinici sull'uomo?

La fase sperimentativa richiede tre tipi di trial clinici che coinvolgono gli esseri umani. Un nuovo farmaco deve passare tutti questi trial prima di venire approvato e commercializzato. Ciascuna fase è studiata per testare aspetti differenti del farmaco. Alcuni passaggi di questa fase sperimentativa possono essere accorciati nel caso di malattie orfane (cioè malattie rare, sia genetiche che infettive, che affliggono meno di 5 persone su 10000) come la SMA.

Cos'è la "pipeline" del farmaco?

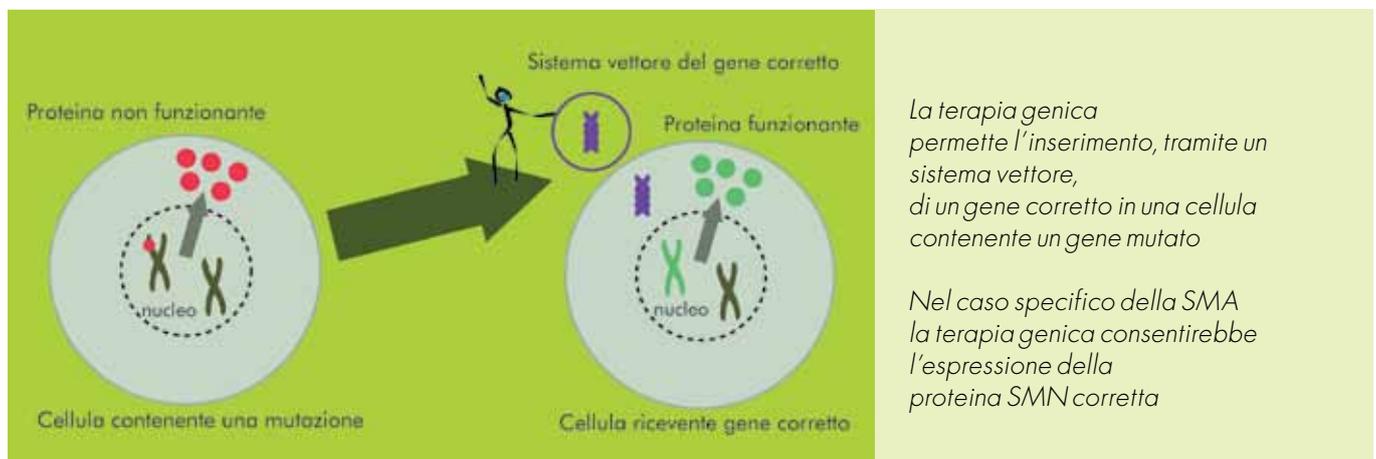
Per "pipeline" del farmaco si intende l'insieme dei candidati farmaci che vengono studiati allo stesso tempo per arrivare ad una terapia. Poiché molti possibili farmaci falliscono la fase di

sperimentazione, è importante avere sempre nuovi candidati da prendere in considerazione. Con una "pipeline" del farmaco quando un possibile trattamento viene scartato, un altro ne prende subito il posto. Costruire una "corsia" del farmaco costituisce un obiettivo importante per la cura della SMA, aumentando le probabilità di successo nello sviluppo di un trattamento per questa patologia.

6 La terapia genica

Cos'è la terapia genica?

La terapia genica è un approccio per il trattamento delle malattie genetiche che modifica l'espressione di un singolo gene oppure lo corregge. La terapia genica si occupa di manipolare il DNA piuttosto che di somministrare un farmaco. Numerose malattie sono oggi considerate candidate per la terapia genica: queste includono la fibrosi cistica, malattie cardiovascolari, malattie infettive come l'AIDS, il cancro e la SMA.



Come si può utilizzare la terapia genica nella SMA?

Nel caso della SMA la terapia genica potrebbe essere impiegata con differenti approcci. Quello più probabile potrebbe essere la sostituzione del gene SMN1 perduto nelle cellule. Un secondo approccio potrebbe sfruttare piccoli segmenti di materiale genetico, chiamati oligonucleotidi, per migliorare il funzionamento del gene di "backup" SMN2. Un terzo approccio potrebbe essere quello di usare la terapia genica per impiegare proteine neuroprotettive come i fattori di crescita per aiutare i motoneuroni a sopravvivere e a funzionare correttamente. La sfida per la terapia genica nella SMA è trovare un modo per far arrivare il materiale genetico al midollo spinale. Infatti nella maggior parte dei casi questi materiali non attraversano la barriera ematoencefalica. Attualmente sono sotto studio un certo numero di virus per la loro capacità di trasportare in maniera sicura ed efficace del materiale genetico attraverso la barriera ematoencefalica, cosa indispensabile per il trattamento di patologie come la SMA.

La sperimentazione pre-clinica dei diversi possibili approcci terapeutici viene effettuata su modelli animali della SMA.

La terapia genica sarà applicata agli esseri umani?

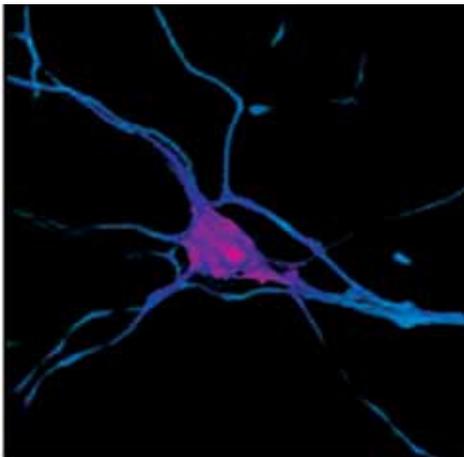
Attualmente non ci sono terapie geniche approvate negli Stati Uniti o in Europa. Terapie di questo tipo sono ancora sotto studio per verificarne l'efficacia in tutta una serie di malattie, compresa la SMA. La sfida principale nello sviluppo di un approccio con la terapia genica è come trasportare efficacemente e in modo sicuro il materiale genetico nel corpo umano.

Cos'è la tecnologia antisenso?

La terapia genica può servirsi della tecnologia antisenso utilizzando i cosiddetti oligonucleotidi antisenso (detti anche ASO, dall'inglese AntiSense Oligonucleotides), brevi molecole a singolo filamento di DNA complementari ad una determinata sequenza di codice genetico, che introdotti nella cellula si legano alla molecola di mRNA o pre-mRNA, producendo il risultato di aggiungere o rimuovere delle sequenze di codice genetico, correggendo il difetto alla base della patologia.

Cos'è la terapia cellulare?

La terapia genica e la terapia cellulare sono campi di ricerca molto vicini, con obiettivi simili. La terapia genica può essere definita come l'uso del materiale genetico per manipolare le cellule di un paziente per il trattamento di una patologia. La terapia cellulare può essere definita come l'inoculazione o il trapianto di intere cellule in un paziente per il trattamento di una patologia. Una tipica applicazione della terapia cellulare riguarda l'utilizzo delle cellule staminali.



Cellula neuronale

Il nucleo cellulare o pirenoforo e prolungamenti detti assoni o dendriti

7 Le cellule staminali

Cosa sono le cellule staminali?

Le cellule staminali sono cellule vive che hanno la caratteristica di potersi sviluppare in differenti tipi di cellule del corpo umano. In molti tessuti viventi le cellule staminali fungono da una sorta di sistema interno di riparazione. Sono capaci di riprodursi incessantemente e di rimpiazzare altre cellule per tutta la lunghezza della vita. Quando una cellula staminale si divide, ciascuna nuova cellula ha il potenziale di rimanere una cellula staminale o diventare un altro tipo di cellula con una funzione specializzata, come una cellula muscolare, un globulo rosso del sangue, o un motoneurone.

Cosa sono le cellule staminali embrionali umane?

Le cellule staminali embrionali umane sono cellule delle prime fasi dell'embrione umano che hanno la potenzialità di formare 200 tipi differenti di cellule umane. Le cellule staminali embrionali umane possono essere cresciute in piastre da laboratorio, dove possono continuare a riprodursi indefinitamente.

Cosa sono le cellule staminali adulte?

Il ruolo delle cellule staminali adulte è quello di mantenere e riparare i tessuti in cui si trovano, tessuti che si sono già sviluppati. La fonte più comune di cellule staminali adulte è il midollo osseo, una sostanza morbida all'interno di alcune ossa. Comunque le cellule staminali adulte possono essere anche ritrovate in molti altri organi e tessuti, incluso il cervello, i vasi sanguigni, i muscoli scheletrici e la pelle. Come per le cellule staminali embrionali, le cellule staminali adulte possono

avere la potenzialità di formare altri tipi di cellule. I ricercatori stanno studiando come le cellule staminali adulte funzionano nel corpo umano, comparandole con le cellule staminali embrionali.

Cosa sono le cellule staminali pluripotenti indotte (iPS)?

Pluripotenti significa con molte potenzialità. In altre parole queste cellule hanno il potenziale di avere destini diversi nel corpo, inclusi tutti i 200 tipi di cellule adulte. Le cellule staminali pluripotenti indotte possono derivare dalla pelle o da altri tipi di cellule adulte che sono trattate per ritornare allo stato di cellule staminali. Così indotte possono diventare poi qualsiasi tipo di cellula specializzata.

Cos'è necessario perché le cellule staminali funzionino nell'uomo?

Data la loro unica capacità rigenerativa (abilità di riprodursi), le cellule staminali offrono un nuovo potenziale per il trattamento di malattie quali il Parkinson, il diabete, le malattie cardiache e la SMA. Ad ogni modo rimane da fare molto lavoro nei laboratori e nelle cliniche per comprendere come usare queste cellule per terapie cellulari. Per realizzare la promessa di nuove terapie cellulari (non ancora approvate) per malattie debilitanti, i ricercatori devono essere capaci di manipolarle per ottenere le necessarie caratteristiche.

In particolare devono capire come far fare alle staminali le seguenti azioni:

- crescere e moltiplicarsi estesamente e generare quantità sufficienti di tessuto;
- specializzarsi nel tipo di cellula desiderato;
- sopravvivere nel paziente dopo il trapianto;
- diventare parte del tessuto circostante dopo il trapianto;
- funzionare appropriatamente per la durata della vita del ricevente;
- evitare di nuocere al paziente in qualunque modo.

Le cellule staminali offrono un'eccitante promessa per terapie future, ma molti ostacoli tecnici rimangono e potranno essere superati soltanto attraverso un incremento della ricerca.

Come possono essere utilizzate le cellule staminali nella SMA?

Le cellule staminali possono essere usate nella SMA per due scopi principali:

- per la ricerca avanzata: le cellule staminali che si sono differenziate in motoneuroni affetti dalla SMA possono essere utilizzate per la ricerca. I ricercatori possono studiare questi motoneuroni SMA per comprendere meglio cosa non funziona correttamente e per testare nuovi farmaci per correggere il problema.
- come terapia per le persone affette da SMA: motoneuroni sani derivati da cellule staminali potrebbero sostituire i motoneuroni difettosi nel corpo (terapia cellulare). Questi nuovi motoneuroni potrebbero anche aiutare i motoneuroni malati e farli funzionare meglio.

8 I trial clinici



Cos'è un trial clinico?

Un trial clinico è uno studio condotto per sperimentare un nuovo farmaco o un altro trattamento su soggetti umani. Ogni nuovo farmaco può portare benefici e possibili rischi. I trial clinici aiutano a valutare l'efficacia e la sicurezza di un possibile nuovo trattamento terapeutico sui pazienti.

Quali sono le fasi dei trial clinici?

I trial clinici sono condotti in fasi diverse; ogni fase è studiata appositamente per aiutare i ricercatori a rispondere a domande differenti.

Nei test di fase I i ricercatori testano per la prima volta un farmaco sperimentale o un trattamento

su un ristretto gruppo di persone (20-80) per valutare la sua sicurezza, determinarne il dosaggio ottimale e identificarne gli effetti collaterali.

Nei test di fase II il farmaco in studio è somministrato ad un gruppo più ampio di persone (100-300) per verificarne l'efficacia e valutarne ulteriormente la sicurezza. Nei test di fase III il farmaco in studio è somministrato a un gruppo molto ampio di persone (1.000-3.000) per confermarne l'efficacia, monitorarne gli effetti collaterali, compararlo con trattamenti già in uso e raccogliere informazioni che consentiranno l'uso del farmaco in tutta sicurezza. Vi sono ancora dei test di fase IV, gli studi di post-marketing, che delineano informazioni aggiuntive legate ai rischi, ai benefici e all'uso ottimale del farmaco. Questi studi sono fatti dopo che il farmaco è approvato e reso disponibile al pubblico.

Chi può partecipare a un trial clinico?

Tutti i trial clinici seguono delle linee guida su chi può parteciparvi in modo da aiutare a produrre risultati credibili. Queste linee guida sono basate su fattori quali l'età, il sesso, il tipo e stadio della malattia, i trattamenti precedenti e altre condizioni mediche. I trial richiedono partecipanti affetti da patologie sotto studio ma anche soggetti sani.

Chi finanzia i trial clinici?

I trial clinici sono finanziati da numerose organizzazioni o singoli individui: medici, istituzioni cliniche, organizzazioni no-profit, fondazioni, gruppi volontaristici e aziende, oltre che agenzie governative.

Dove hanno luogo i trial clinici?

I trial clinici si svolgono negli ambulatori medici, nelle cliniche o negli ospedali, in città o paesi di un singolo stato o di più nazioni.

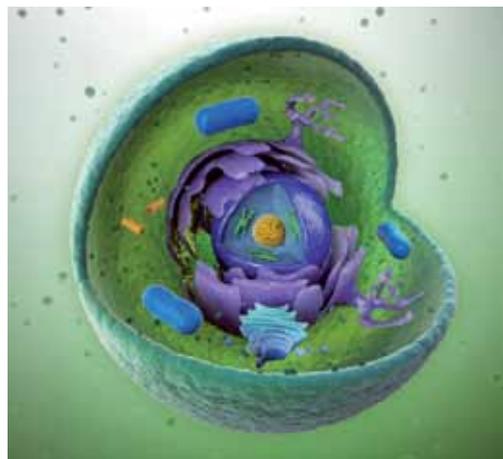
9 La genetica della SMA

Cos'è il DNA?

Nel genoma umano ci sono circa 30.000 geni che forniscono il progetto-modello per tutte le proteine che sono richieste per far funzionare ciascuna cellula del nostro corpo. I mattoni di questo progetto sono molecole chiamate DNA, acido deossiribonucleico.

Ci sono quattro differenti mattoncini chiamati nucleotidi, adenina (A), timina (T), citosina (C) e guanina (G) e queste molecole nucleotidi sono messe assieme come biglie in fila per formare una collana o sequenza di DNA.

È la particolare sequenza di DNA di questi quattro nucleotidi che distingue un gene dall'altro. La sequenza completa del genoma umano oggi è pubblicamente disponibile. Questa sequenza è il progetto della vita!



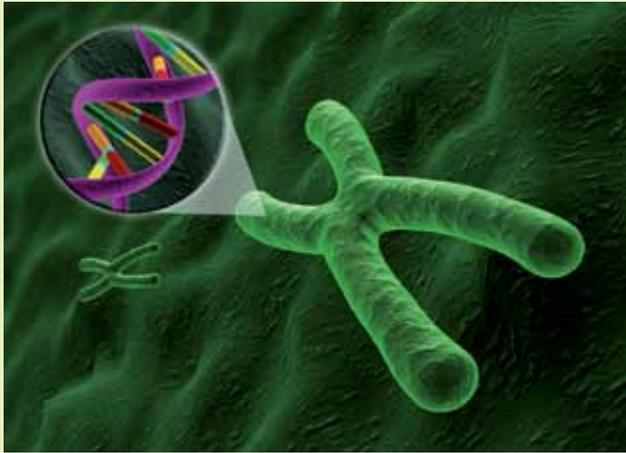
Il patrimonio genetico di un individuo è costituito dalla doppia elica del DNA fatta dall'alternanza di 4 distinti nucleotidi, o basi. Le strutture cellulari che contengono il DNA si chiamano cromosomi e sono localizzati nel nucleo della cellula.

Cos'è un cromosoma?

Il genoma umano completo contiene 3 miliardi di molecole di DNA e se questo DNA fosse "srotolato" misurerebbe circa 1.5-1.7 metri.

È difficile immaginare che tutto questo materiale sia presente nel nucleo di ciascuna cellula! Perché questo accada il DNA si avvolge attorno a proteine che sono poi impacchettate in strutture molto compatte chiamate cromosomi.

Ciascuna cellula umana contiene 46 cromosomi o 23 paia di cromosomi (un cromosoma di ciascun paio viene ereditato dal proprio padre e uno dalla propria madre).



Cromosoma umano visualizzato al microscopio elettronico a trasmissione

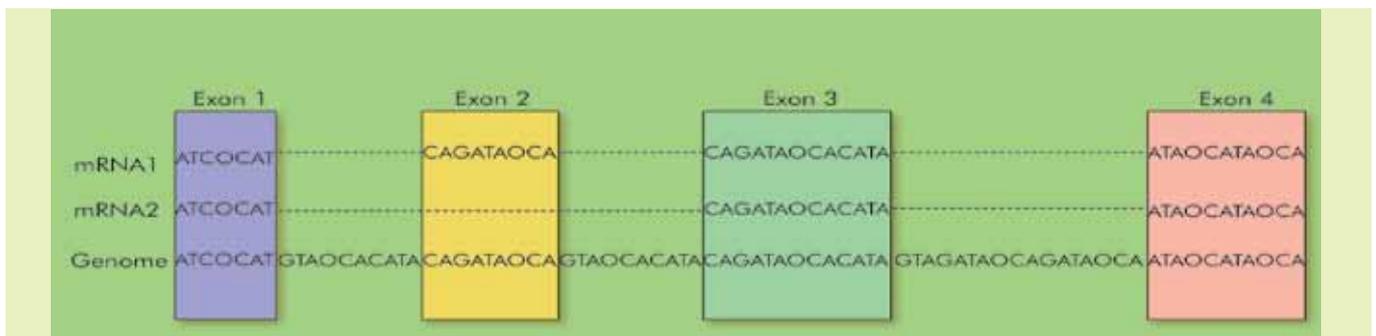
Cos'è un gene?

Un gene è una specifica sequenza di DNA che contiene tutte le informazioni per produrre una certa proteina in un determinato momento e in una specifica cellula.

Ciascun gene codifica per una particolare proteina che avrà il proprio ruolo nelle cellule. Per esempio un gene può produrre una proteina per tutto il tempo in tutte le cellule; un altro può produrre una proteina nelle cellule epatiche solo nel feto di 2 mesi.

Tutte le informazioni che controllano quando e dove un gene deve attivarsi sono contenute nelle sequenze regolatorie del gene, chiamate promotori e sequenze introniche.

Il codice che funge da progetto per la molecola di proteina è esso stesso contenuto in specifiche regioni chiamate esoni.



Gli esoni sono porzioni di un gene che contengono il progetto per la costruzione di una proteina. L'mRNA1 sarà formato dall'unione di tutti e 4 gli esoni rappresentati. L'mRNA2 sarà privo dell'esone 2, la relativa proteina potrebbe essere poco o per nulla funzionante, come nel caso della proteina SMN

Come si produce una proteina a partire da un gene?

Prima di tutto la sequenza di DNA deve essere ricopiata in un messaggio.

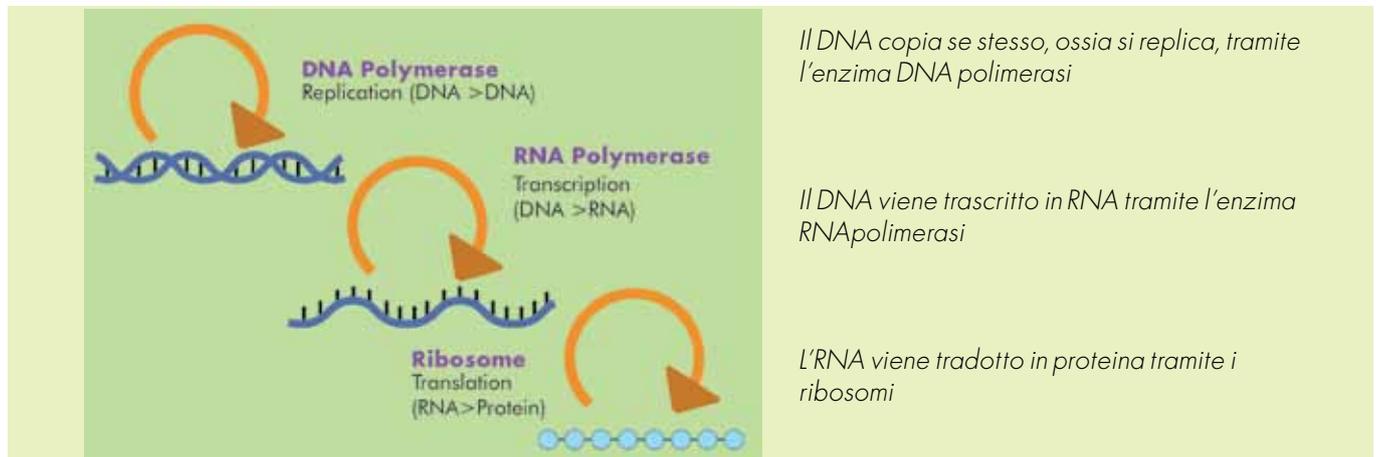
Questo messaggio è il progetto per la proteina. I mattoncini di questo progetto, gli RNA messaggeri (mRNA), sono molecole chiamate acidi ribonucleici o RNA.

Una volta che la sequenza di DNA è stata copiata in RNA gli introni – sequenze che non servono

per decodificare la proteina - devono essere rimossi e gli esoni messi assieme per mezzo di un processo chiamato splicing dell'mRNA.

Immaginiamo un paio di forbici che tagliano l'RNA all'inizio ed alla fine di ogni esone e rimuovono gli introni, seguite da ago e filo che cuciono assieme gli esoni per formare una molecola di RNA più corta.

Il passaggio successivo in questo processo è usare questo RNA per produrre la proteina. I mattoncini per costruire le proteine sono le 20 differenti molecole di aminoacidi.

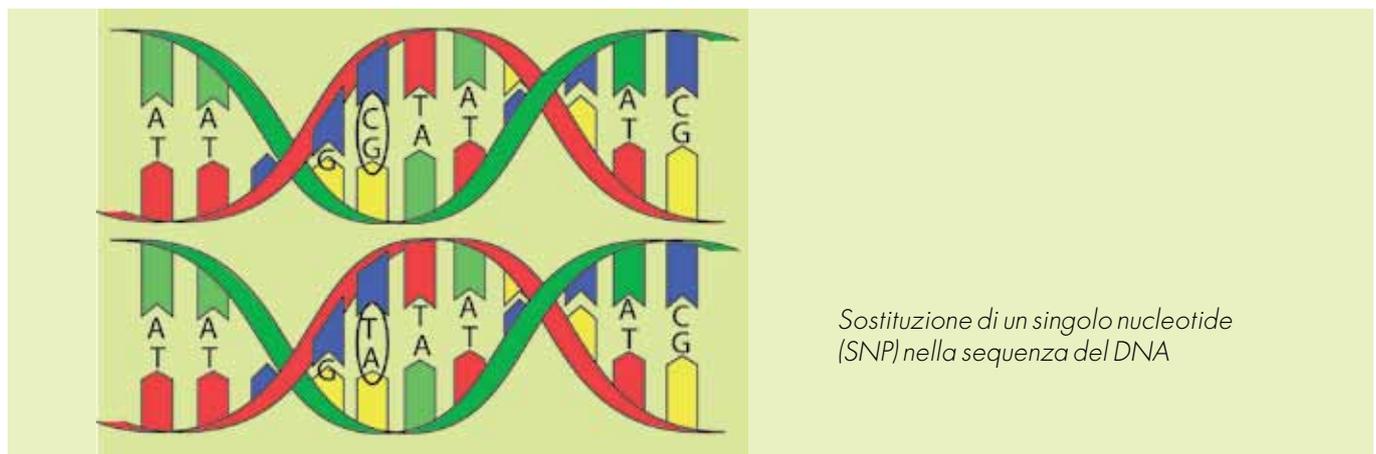


Cosa sono le mutazioni?

Una mutazione è un errore nella sequenza del DNA: esso sarà copiato nel trascritto di mRNA e influenzerà la produzione finale della proteina.

Ci sono diversi tipi di mutazioni, ecco alcuni esempi:

- Il "motore" di un gene è chiamato promotore. Il promotore guida la produzione del trascritto RNA, indica dove (in quale tipo di cellula) e quanta proteina verrà prodotta. Fondamentalmente controlla se un gene è acceso o spento. Se si ha una mutazione nel promotore, si produrrà troppo o troppo poco RNA.
- Se un singolo nucleotide del DNA viene modificato potrebbe alterare la funzione della proteina stessa. Questo tipo di sostituzione di un singolo nucleotide è chiamato mutazione puntiforme.
- Se piccoli frammenti di DNA sono completamente rimossi, si parla di delezione, quindi l'RNA mutante produrrà una proteina con un frammento in meno. Delezioni di uno o più esoni del gene della distrofina sono la causa comune della distrofia muscolare di Duchenne, mentre delezioni complete del gene SMN1 sono responsabili dell'atrofia muscolare spinale.



10 L'ereditarietà

Cos'è l'ereditarietà?

Nel contesto genetico si parla di ereditarietà riferendosi al passaggio di materiale genetico da una generazione all'altra. Il materiale genetico è contenuto nei cromosomi, che tutti noi abbiamo ereditato per metà dal nostro padre biologico e per l'altra metà dalla nostra madre biologica. In tutto si tratta di 22 paia di autosomi, i cromosomi numerati dal 1 al 22, e 2 cromosomi legati al sesso. Possediamo due cromosomi X se siamo di sesso femminile, un cromosoma X e un Y se siamo maschi. Una caratteristica genetica può essere dominante o recessiva.

Per ereditarietà autosomica dominante si intende una caratteristica che viene trasmessa dal genitore al figlio, il quale la esprimerà anche se contenuta in uno solo dei geni ereditati. Se si tratta di una caratteristica patologica il prodotto di un gene soltanto non è sufficiente dunque per un funzione normale.

Per ereditarietà autosomica recessiva si intende una caratteristica che viene espressa dal figlio soltanto se trasmessa da entrambi i genitori. Nel caso di caratteristica patologica il bambino erediterà due copie difettose (mutate) del gene, una da ciascun genitore.

La SMA è una malattia autosomica recessiva. Tipicamente i genitori di una persona affetta posseggono soltanto una copia del gene coinvolto nella malattia: essi sono asintomatici e sono definiti portatori sani della malattia. Si stima che in media nel mondo 1 persona su 40 sia portatore sano della SMA. Due portatori sani possono generare un figlio sano, affetto o portatore sano, secondo le seguenti percentuali di probabilità:

- 25% che sia affetto dalla SMA,
- 50% che sia portatore sano,
- 25% che sia sano.

Vi è infine un'ereditarietà legata al sesso: poiché la maggior parte dei geni legati al sesso è presente nel cromosoma X, l'ereditarietà legata al sesso è solitamente associata al cromosoma X. Anche in questo caso un tratto può essere dominante o recessivo.

Se il tratto è dominante sia le femmine che i maschi esprimeranno il tratto. Se il tratto è recessivo solitamente solo i maschi lo esprimeranno, poiché hanno un solo cromosoma X. Le patologie legate al cromosoma X meglio conosciute sono l'emofilia A e la distrofia muscolare di Duchenne (DMD).

Quali sono le basi genetiche della SMA?

Studi genetici su famiglie con pazienti SMA hanno consentito ai ricercatori di localizzare nel 1992 la regione contenente il gene responsabile della SMA nel braccio lungo del cromosoma 5.

Contributi da ogni parte del mondo e soprattutto il lavoro del team della dott.ssa Judith Melki (Parigi, Francia) hanno portato all'identificazione del gene della SMA nel 1995; questo gene è stato chiamato SMN e cioè "sopravvivenza dei motoneuroni".

Gli esseri umani hanno due copie quasi identiche di questo gene, chiamate SMN1 e SMN2. La maggiore differenza funzionale fra SMN1 ed SMN2 si trova nell'esone 7. La differenza riguarda un singolo nucleotide (C in SMN1 e T in SMN2) dell'esone 7 ed è cruciale per la produzione di proteina SMN stabile e pienamente funzionale.

Poiché l'mRNA del gene SMN2 esclude l'esone 7, la proteina prodotta dal gene SMN2 manca di un pezzo della normale proteina. Quindi il solo gene SMN2 non può provvedere a una quantità sufficiente di proteina SMN (intera, con l'esone 7) pienamente funzionale, che è necessaria per la sopravvivenza dei motoneuroni per tutto lo sviluppo.

Esistono inoltre un certo numero di affezioni che coinvolgono geni diversi dal SMN1, non localizzati nel cromosoma 5. Queste forme di SMA si definiscono non-SMA-5q per differenziarle dalla forma tipica, SMA-5q. I sintomi di queste forme più rare sono simili a quelli della forma 5q anche se alcune caratteristiche sono molto differenti (per esempio debolezza dei soli arti, contratture, paralisi diaframmatica e degenerazione cerebellare).

11 Le mutazioni nella SMA

Quali sono le mutazioni del gene SMN1?

La maggior parte delle mutazioni responsabili per la SMA-5q sono delezioni o conversioni.

Una delezione implica la parziale o completa rimozione del gene SMN1.

Per esempio i pazienti SMA di tipo 1 generalmente mancano di entrambi i geni SMN1 ed hanno 1 o 2 copie SMN2.

Nella conversione, il gene SMN1 è convertito in un gene tipo SMN2, poiché il nucleotide C nell'esone 7 viene cambiato in T.

Questo gene convertito produce la maggior parte dei trascritti mRNA privi dell'esone 7.

La maggior parte dei pazienti SMA di tipo 3 hanno 1 o 2 geni SMN1 convertiti.

Quindi sono privi di geni SMN1 ed hanno 3 o 4 geni SMN2.

In entrambi i casi, delezione e conversione, i pazienti SMA mancano dell'esone 7 in SMN1, condizione detta assenza omozigotica dell'esone 7 di SMN1.

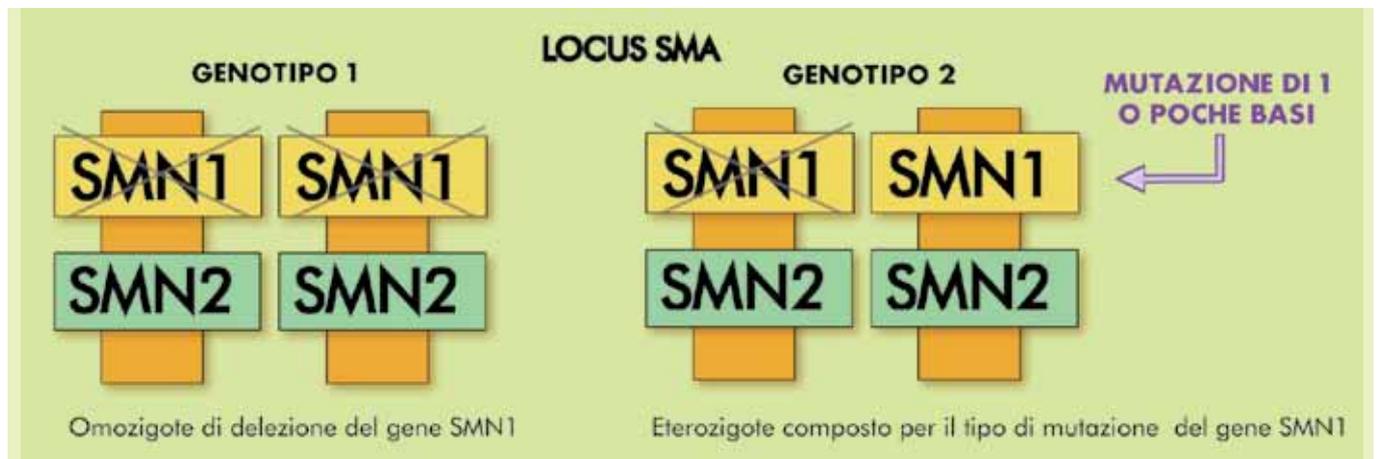
Quindi i pazienti SMA producono una quantità insufficiente di proteina SMN completa (cioè comprendente l'esone 7).

Le rimanenti mutazioni che causano la SMA sono mutazioni puntiformi che riguardano solo pochi nucleotidi del gene SMN1.

Queste mutazioni puntiformi portano alla produzione di proteina SMN non funzionale o non stabile.

Poiché le mutazioni delezione o conversione sono molto frequenti e le mutazioni puntiformi molto rare, circa il 96% dei pazienti SMA sono omozigoti per mutazioni delezione o conversione: hanno mutazioni delezione o conversione su entrambi i loro cromosomi 5.

In alcuni casi rari (circa il 4%) sono eterozigoti composti: hanno mutazioni delezione o conversione su un cromosoma 5 e mutazione puntiforme sull'altro.



12 I test genetici

Cos'è il test del DNA?

Il DNA è il materiale genetico che si trova in ciascuna cellula del corpo. La diagnosi e la ricerca dei portatori sani sono spesso fatte sulla base di questo test, con il prelievo di un piccolo campione di sangue, utilizzato per preparare il DNA. Se non si è affetti da una malattia genetica il DNA può essere usato per verificare se si è portatori di una certa mutazione per quella malattia genetica.

La diagnosi prenatale viene generalmente utilizzata per rilevare i cambiamenti nella sequenza del DNA (mutazioni) che provocano le malattie genetiche.

Perché fare il test del DNA?

Il test del DNA è importante quando ad un membro della famiglia è stata diagnosticata una malattia genetica e quando il gene e le mutazioni responsabili di questa malattia sono stati identificati. Quando questi strumenti e conoscenze sono disponibili, il test del DNA può essere eseguito per le seguenti motivazioni:

- Diagnosi: per determinare se si ha quella specifica malattia.
- Test per portatore sano: per determinare se i parenti o la persona sono portatori sani. Se davvero lo sono si ha il rischio di avere un figlio con questa malattia.
- Test prenatale: per determinare se il nascituro ha ereditato questa malattia genetica.

Quali sono i test prenatali?

L'amniocentesi è il tipo di test prenatale più diffuso.

Il test è solitamente effettuato a partire dalla 14esima settimana di gravidanza. Un ago molto sottile viene inserito nell'addome della donna e viene estratto del liquido amniotico che circonda il feto. Questo liquido contiene cellule fetali che vengono usate per preparare il DNA, che viene poi esaminato per rilevare malattie genetiche come la SMA.

Il rischio di aborto associato all'amniocentesi è di 1 su 200.

Un altro test prenatale è la villocentesi, che viene solitamente eseguita precocemente fra la decima e la dodicesima settimana di gestazione.

Viene prelevato dall'addome della donna un campione delle piccole strutture digitiformi che formano la placenta (i villi coriali). Una volta estratte, queste cellule sono usate per preparare il DNA e quindi determinare se il nascituro avrà una malattia genetica come la SMA. Il rischio di aborto associato alla villocentesi è di 1 su 100.

Il test diagnostico

Poiché entrambe le copie dell'esone 7 del gene SMN1 mancano nella maggior parte dei soggetti affetti da SMA, si può effettuare un semplice test del DNA per rilevare la presenza o assenza del gene SMN1. SMN1 sarà presente quando il DNA deriva da individui con 1 o 2 copie normali del gene. SMN1 sarà assente quando il DNA deriva da individui con la forma 5q della SMA.

Poiché circa il 96% dei pazienti SMA possiede cambiamenti nel DNA che possono essere rilevati con questo tipo di test, cioè delezioni, mutazioni, conversioni di geni in omozigosi, il test diagnostico per SMN è detto avere circa il 96% di sensibilità.

Questo significa che può rilevare circa il 96% dei pazienti SMA-5q. Circa 1 paziente su 25 (il 4%) ha una mutazione puntiforme rara che non è rilevata da questo test del DNA.

Il test per portatori sani

Il test diagnostico SMN non è sufficientemente sensibile per determinare se un individuo ha una o due copie del gene SMN1; può infatti solo rilevare se SMN1 è presente o assente. Quindi il test diagnostico non può distinguere fra i soggetti sani e i portatori sani.

Lo stato di portatore viene determinato con un test di PCR quantitativa, un test molto più complesso e lungo ma molto sensibile.

Gli individui con 1 copia di SMN1 sono portatori della SMA-5q. Poiché la maggior parte dei cromosomi 5 hanno il gene SMN1, si può essere quasi sicuri che un individuo con una sola copia di SMN1 sia un portatore sano di SMA-5q. Tuttavia vi è una piccola percentuale di individui che possiede le due copie del gene SMN1 su un solo cromosoma; questi casi sfuggono anche a questo test.

Un individuo con due copie di SMN1 può essere un portatore sano?

Sì, circa il 2-3% della popolazione possiede 2 copie del gene SMN1 su un cromosoma 5 e nessuna sull'altro.

Anche se il test del portatore mostra che una persona ha due copie di SMN1, c'è il 2-3% di

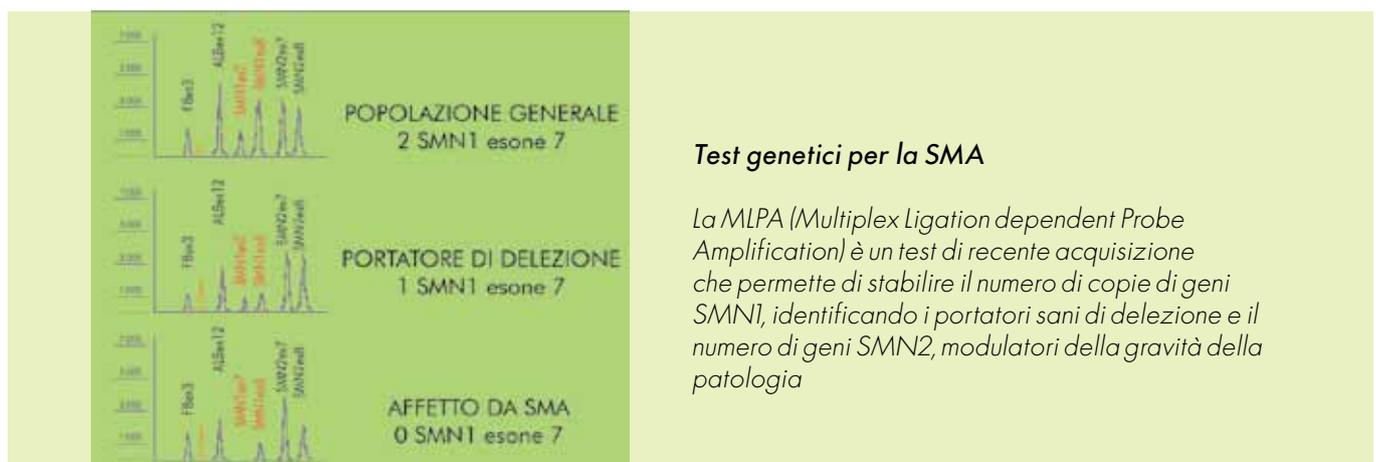
probabilità che questa persona abbia le due copie sullo stesso cromosoma e quindi nessuna copia nell'altro cromosoma.

Questa persona è un portatore sano ma non sarà rilevato dal test.

Sappiamo anche che mutazioni "de novo" vengono rilevate in circa il 2% delle famiglie SMA. Una mutazione "de novo" avviene nell'ovocita o nello spermatozoo e viene trasmessa alla prole, ma la stessa mutazione non è presente nelle cellule del sangue della persona sottoposta al test della mutazione SMN1.

Una persona con una mutazione "de novo" avrebbe due copie del gene SMN1 (e quindi risulterebbe non portatore) ma avrebbe comunque il rischio di generare un figlio affetto da SMA.

A causa della possibilità di avere 2 geni SMN1 sullo stesso cromosoma nonché delle mutazioni "de novo" del gene SMN1, la sensibilità del test del portatore non è del 100%. Il test quantitativo del portatore può rilevare circa il 97% dei portatori sani nella popolazione generale.



13 Il gene SMN2

Il numero di copie del gene SMN1 negli esseri umani varia nella popolazione.

Il numero di copie di geni SMN2 possedute da una persona è correlato alla severità della malattia: maggiori sono le copie minore è la gravità.

Ogni soggetto affetto da SMA possiede almeno una copia del gene SMN2, poiché una minima quantità di proteina SMN è necessaria per la sopravvivenza di tutte le cellule del corpo.

Il numero di copie di SMN2 è stato anche dimostrato ridurre la severità della SMA nei topi.

Risultati ottenuti nel laboratorio del dott. Burghes presso l'Ohio State University indicano che aggiungendo copie del gene SMN2 in topi affetti da SMA viene ridotta la severità dei loro sintomi. Per esempio topi a cui vengono aggiunte 8 copie di SMN2 non mostrano più alcun sintomo della malattia.

La correlazione osservata ha portato all'idea che incrementare i livelli di proteina SMN prodotti dal gene SMN2 possa essere una valida strategia terapeutica.

Il gene SMN2 è presente in tutti i pazienti SMA e può essere visto come una copia di backup del gene SMN1.

L'obiettivo terapeutico è quindi quello di aumentare la quantità di proteina prodotta dal gene SMN2 e questo potrebbe essere ottenuto in diversi modi:

- Il primo è quello di aumentare l'attività del promotore del gene SMN2 per produrre più mRNA e dunque proteina SMN.
- Il secondo è quello di correggere lo splicing difettoso dell'RNA di SMN2.
- Il terzo è quello di trovare dei farmaci che stabilizzino la proteina prodotta dal gene SMN2.

Un certo numero di composti quali il butirrato di sodio, il fenilbutirrato, il valproato, l'idrossiurea

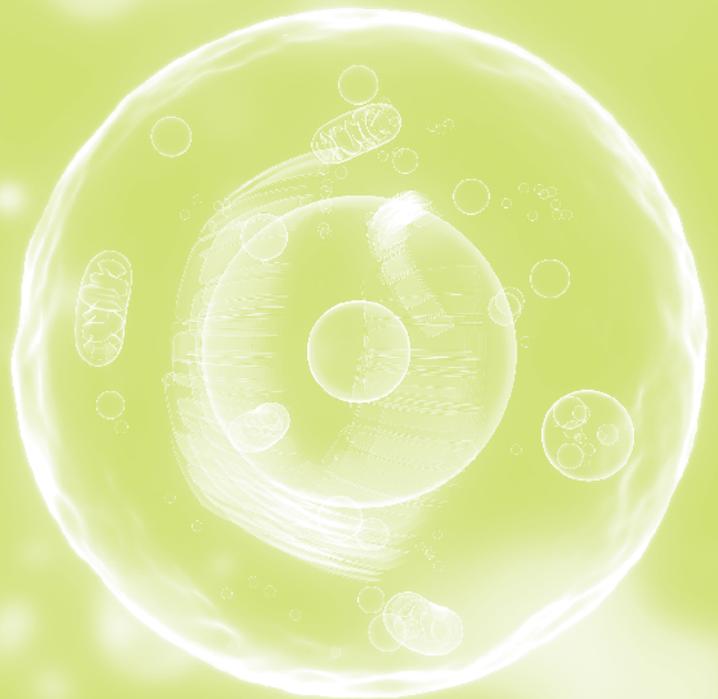
e l'aclarubicina sono già stati evidenziati aumentare i livelli di proteina SMN nei modelli cellulari di SMA. Alcuni di essi (valproato, fenilbutirrato, idrossiurea) sono stati anche approvati per l'uso in altre malattie e sono attualmente studiati in test clinici per la SMA.

La speranza è che la particolare situazione genetica della SMA, in cui una copia del gene è presente (SMN2), possa portare a un trattamento efficace per questa malattia.



14 In breve

1. La SMA è una malattia genetica autosomica recessiva causata dalla mutazione di entrambe le copie del gene SMN1 localizzato nel cromosoma 5. Questa forma è chiamata SMA-5q.
2. Le persone che hanno una sola copia del gene SMN1 sono chiamate portatori sani e non sono affetti dalla malattia.
3. In circa il 98% dei casi entrambi i genitori di un paziente SMA sono portatori sani. In rari casi la mutazione nel gene SMN1 avviene durante la produzione dell'ovocita o dello spermatozoo e in tali casi soltanto un genitore risulterà portatore sano.
4. Nel caso di genitori portatori sani, essi avranno una probabilità del 25% di procreare un figlio malato, del 50% di avere un figlio portatore sano e del 25% di avere un figlio perfettamente sano.
5. La SMA è causata dal deficit della proteina SMN. Essa può derivare da tre differenti tipi di mutazioni: delezione del gene SMN1, conversione del gene SMN1 in simil-SMN2, mutazione puntiforme del gene SMN1.
6. Il 96% dei pazienti SMA-5q possiede mutazioni di tipo delezione o conversione del gene. Soltanto il 4% dei pazienti presenta mutazioni puntiformi del gene SMN1.
7. Il test diagnostico del DNA può identificare soltanto delezioni e conversioni del gene SMN1. Questo significa che può essere diagnosticato solo il 96% dei casi di SMA-5q.
8. I test prenatali possono identificare il 95% dei casi di SMA, attraverso l'amniocentesi e la villocentesi.
9. I test per portatori sani SMA può attualmente individuare il 97% dei casi con una copia soltanto del gene SMN1. Sfuggono al test i casi di portatori sani SMA con due copie del gene SMN1 su un cromosoma e nessuna sull'altro.
10. Esistono altre forme di SMA che non sono causate da mutazioni del gene SMN1. Circa il 4-5% dei pazienti SMA sono affetti da forme non-5q. Queste forme della malattia sono anch'esse caratterizzate da debolezza muscolare e perdita motoneuronale; tuttavia presentano delle peculiarità uniche non comuni alle forme 5q. Esse sono causate da mutazioni di geni diversi da SMN1, localizzati in altri cromosomi. Per alcune di esse sono disponibili attualmente dei test diagnostici del DNA.



Credits

Realizzata dal dott. **Paolo Pisano** - www.ricercasma.it con l'approvazione del Comitato Scientifico di Famiglie SMA e con il contributo della dott.ssa Renata Lonigro dell'Università di Udine e delle ricercatrici del suo laboratorio.

Visual communication - Sofonisba Commercial Art Agency
Milano - www.sofonisba.it

Luglio 2011

