



LIFC  
Lega Italiana  
Fibrosi Cistica

I WEBINAR DEL MARTEDÌ

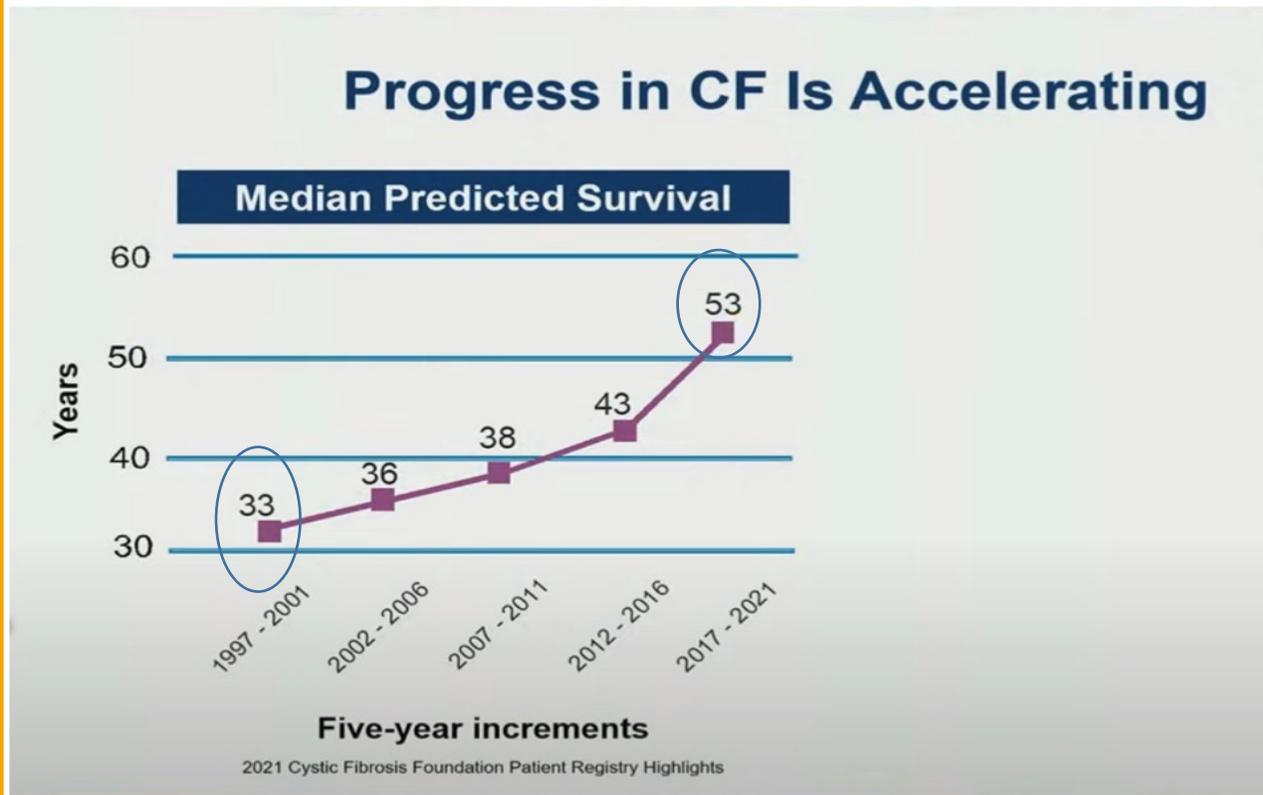


# MUTAZIONI NON SENSE E SPLICING: sfide terapeutiche

30 Maggio ore 18:00

zoom

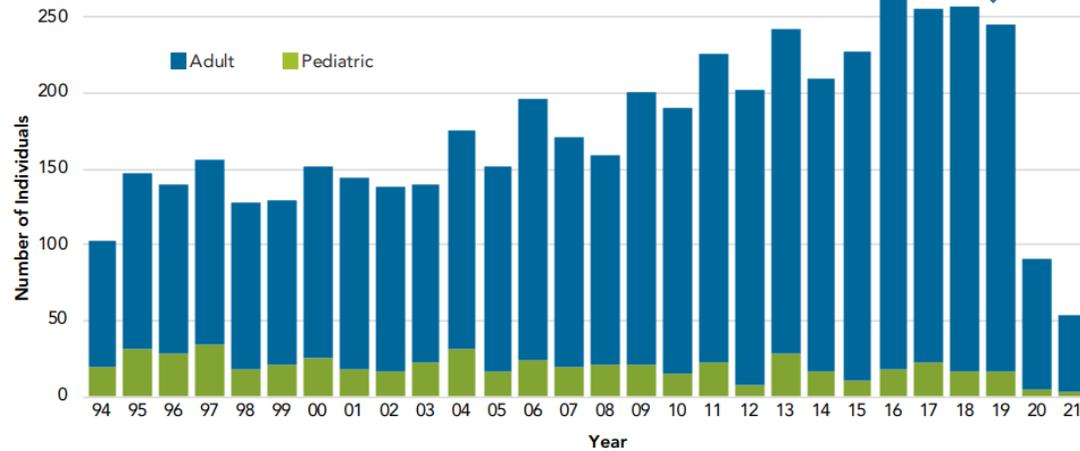
# A che punto siamo?



- *L'età mediana è in rapido aumento*
- più della metà della popolazione FC è adulta
- i trapianti sono calati notevolmente
- sono in aumento le gravidanze, una condizione che precedentemente si tendeva a sconsigliare.

# Registro nord americano 2022

Number of Individuals Receiving a Lung Transplant, 1994-2021



**Trikafta dal 2019**

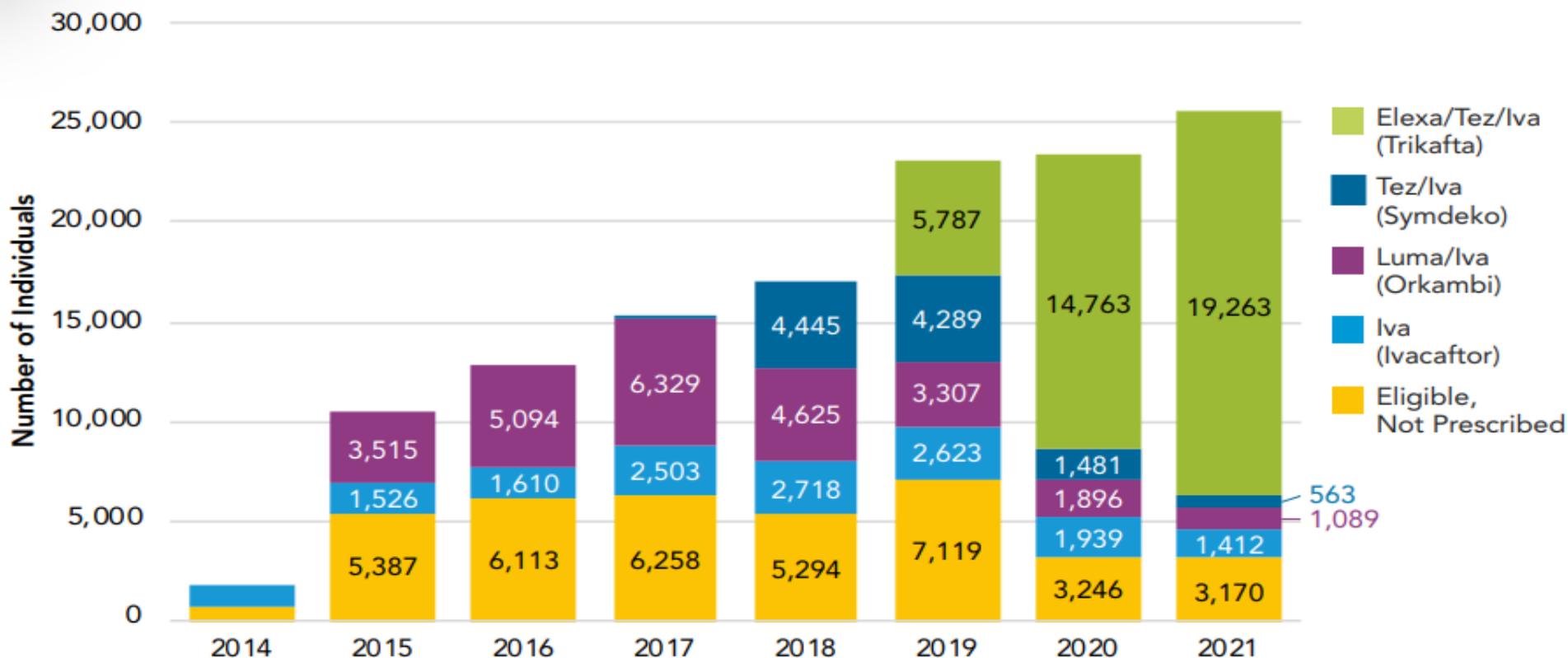
Number of Pregnancies in Women 14 to 45 Years with CF, 2011-2021





# Registro nord americano 2022

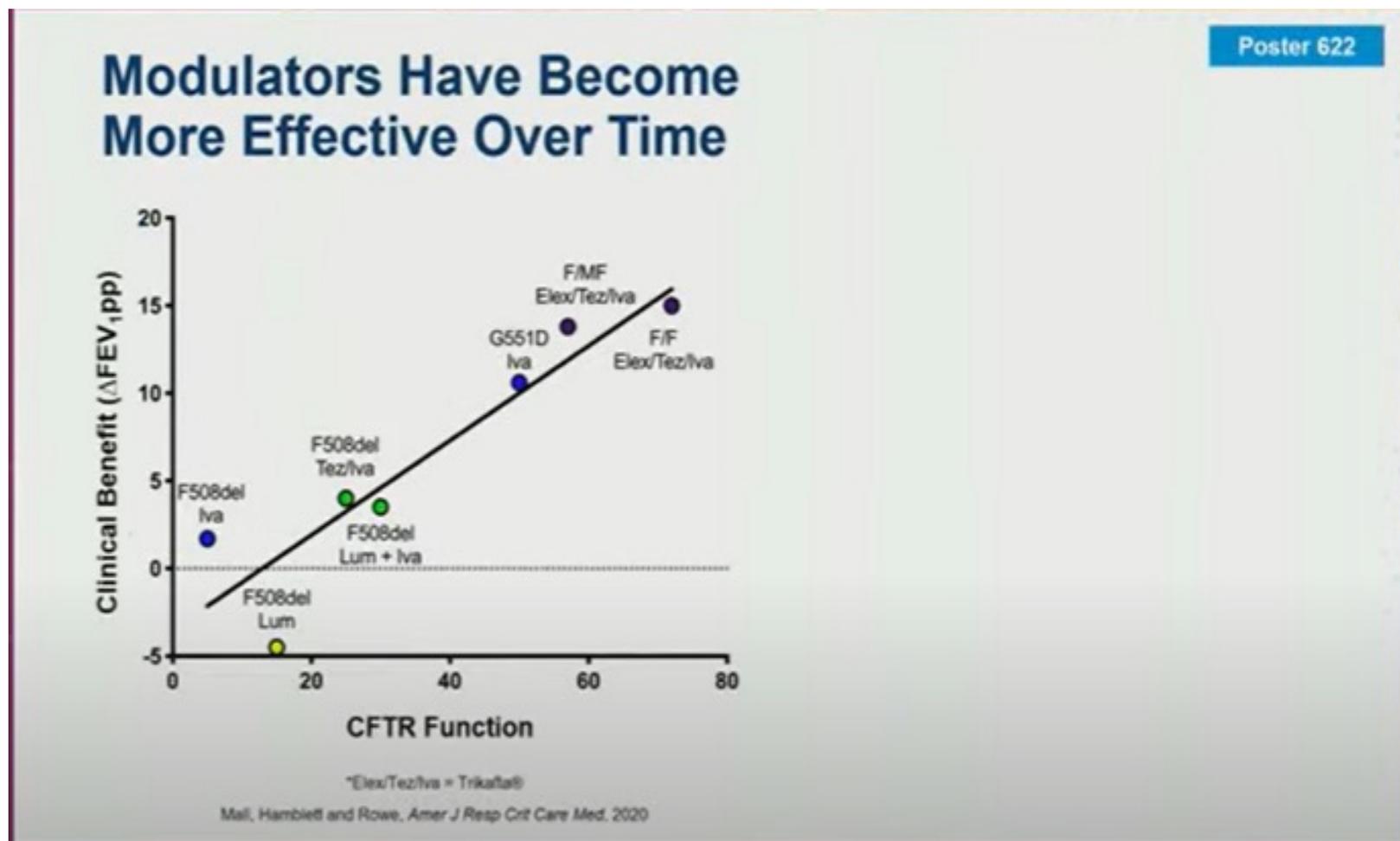
CFTR Modulators by Year, 2014–2021



	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021
<b>Total Eligible</b>	1,764	10,428	12,817	15,196	17,082	23,125	23,325	25,497
<b>% Eligible on Modulators</b>	60.6%	48.3%	52.3%	58.8%	69.0%	69.2%	86.1%	87.6%
<b>Total on Modulators</b>	1,069	5,041	6,704	8,938	11,788	16,006	20,079	22,327

# Registro nord americano 2022

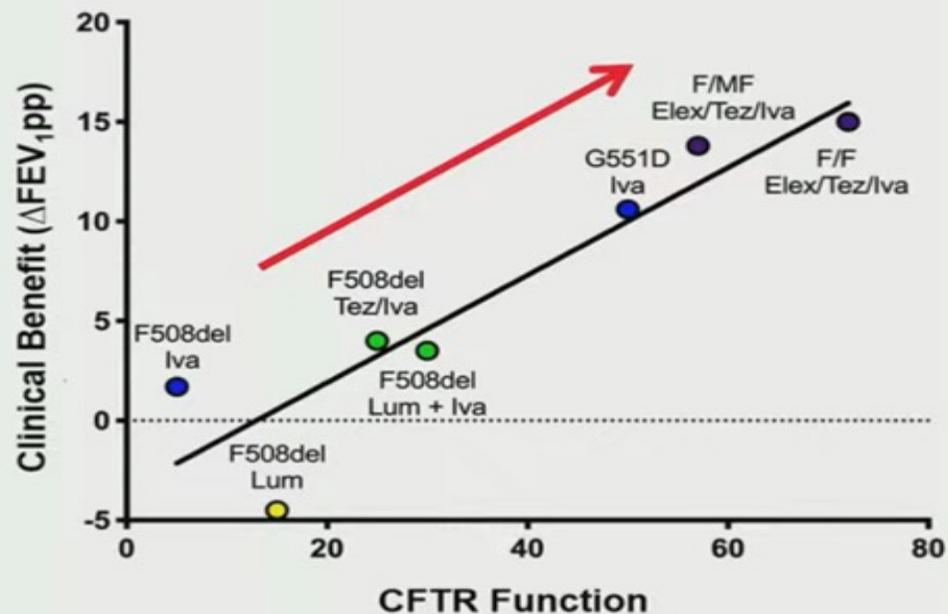
## Attività dei modulatori nel tempo



# Registro nord americano 2022

## Attività dei modulatori nel tempo

### Modulators Have Become More Effective Over Time



\*Elex/Tez/Iva = Trikafta®

Mall, Hamblett and Rowe, *Amer J Resp Crit Care Med*, 2020

### Gli effetti dei modulatori altamente efficaci:

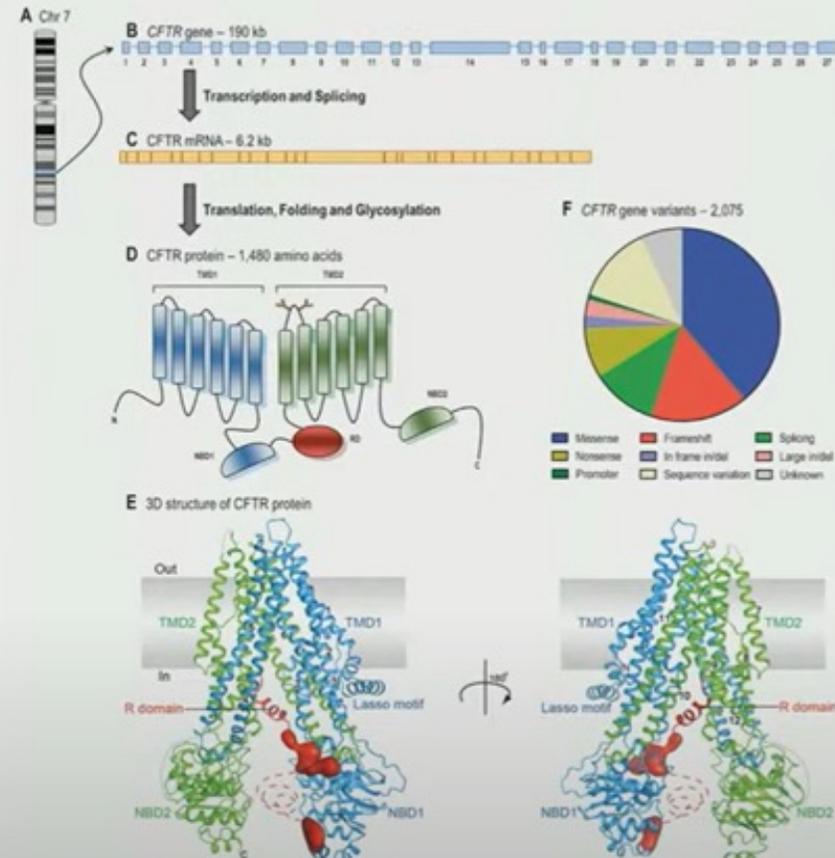
- Aumento della sopravvivenza
- Miglioramento funzione polmonare
- Riduzione riacutizzazioni polmonari
- Miglioramento sintomi respiratori
- Riduzione del declino funzione polmonare
- Aumento della clearance del muco
- Riduzione dell'inflammation polmonare
- Incremento peso
- Riduzione del cloro sudorale
- Conservazione della funzione pancreatica

# Registro nord americano 2022

## Diversità di mutazioni nella FC

### Diversity of CF

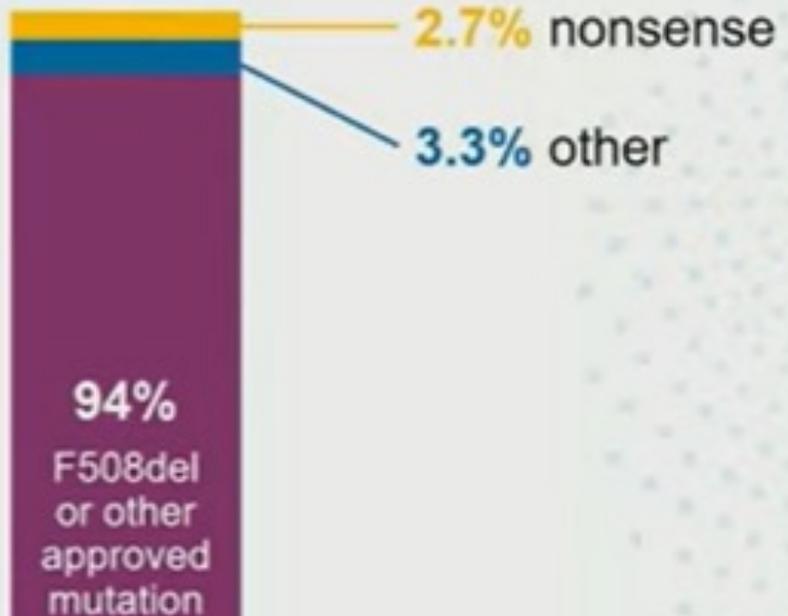
- ~40,000 people in US; >100,000 worldwide; occurs in any race & ethnicity
- Mutations in *CFTR*; disease severity & manifestations vary
- >2,000 variants
- Not all *CFTR* mutations can be treated with modulators



# Registro nord americano 2022

## Panorama dei modulatori della CFTR

Nel Mondo circa il 94% dei pz FC può beneficiare dei modulatori altamente efficaci della CFTR



*In Italia però solo il*  
**70%** *circa*

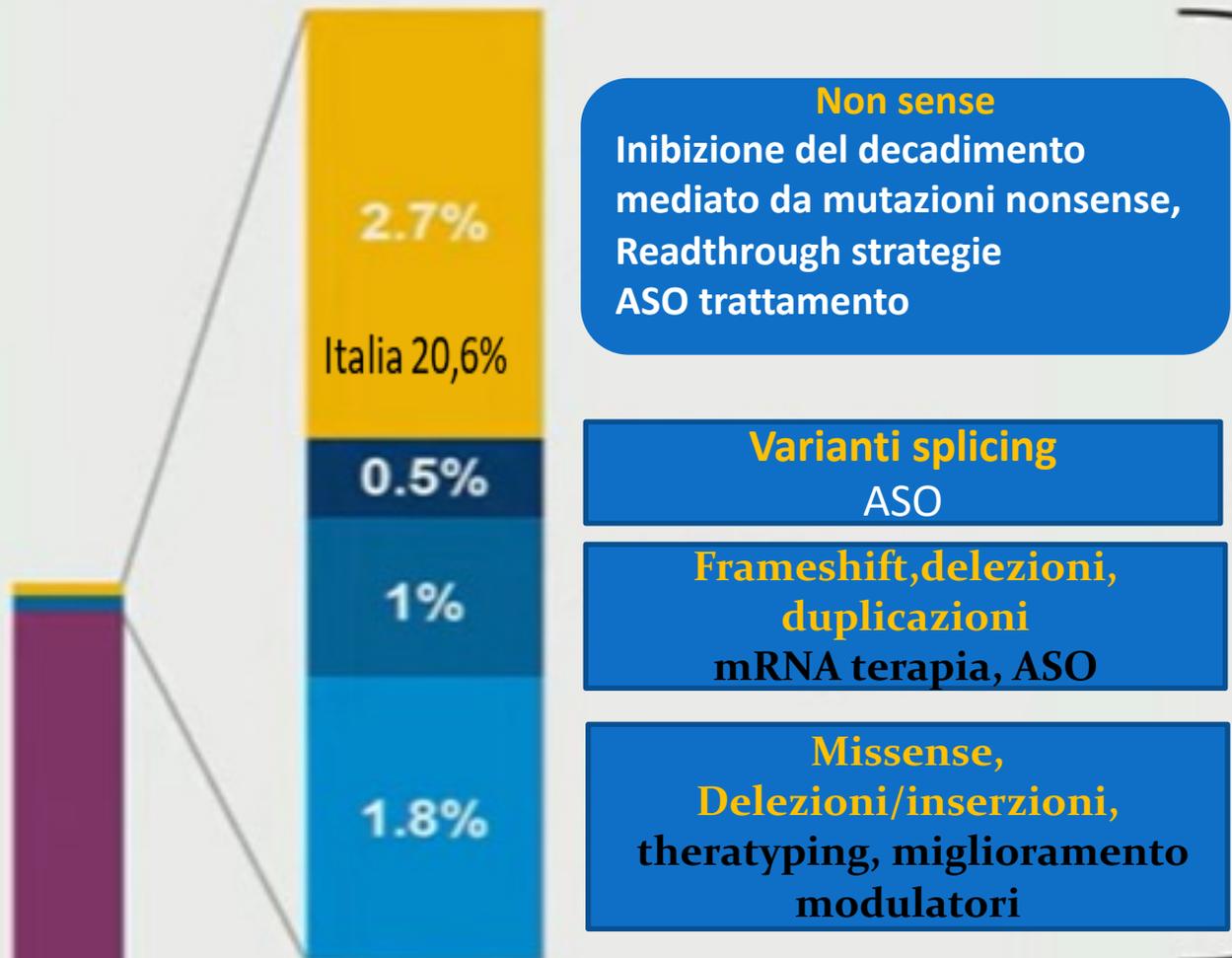


# Frequenza mutazioni CFTR in Italia

## da Report RIFC 2020

	• F508del*	62%
	• <b>Non sense (stop)</b>	<b>20,6%</b>
	• Gating*	3,4%
	• Altre	14%

\*mutazioni corrette da modulatori CFTR



**Non sense**  
Inibizione del decadimento mediato da mutazioni nonsense, Readthrough strategie ASO trattamento

**Varianti splicing**  
ASO

**Frameshift, delezioni, duplicazioni**  
mRNA terapia, ASO

**Missense, Delezioni/inserzioni,**  
theratyping, miglioramento modulatori

Ma c'è molto lavoro da fare

Nel Mondo il 6% dei pazienti non ha ancora una terapia per le sue mutazioni, in Italia ~30%

Data provided by Dr. Garry Cutting and Karen Raraigh, CFTR2, U.S. and other countries, Johns Hopkins University



Molti sono gli studi e le sperimentazioni in corso per raggiungere l'obiettivo del trattamento di tutti i pazienti FC, ci concentreremo in questo meeting sull'**mRNA x il recupero della CFTR** e la **correzione splicing della CFTR**, che rappresentano due delle opportunità a breve termine per migliorare le condizioni di vita delle persone con FC.



## Ricordiamo cosa significa mutazione non sense

Le mutazioni non sense (note anche come mutazioni "x" o "stop") causano l'**arresto prematuro** della produzione della proteina CFTR per mezzo di un codone di stop PTC. Ciò porta ad una proteina tronca e non funzionale che la cellula riconosce come difettosa e distrugge.

Le ricerche in corso hanno l'obiettivo di individuare composti che possano consentire di ignorare i segnali di arresto prematuro in modo da poter produrre una proteina a lunghezza intera. Questi composti conosciuti come «**agenti readthrough**» perché potrebbero "leggere" e bypassare i segnali di arresto prematuro.



## Ricordiamo cosa significa mutazione non sense

ma

Le mutazioni non sense riducono anche la **quantità di tempo** in cui l'**mRNA** che codifica per la proteina CFTR rimane nella cellula, diminuendo così la quantità di proteina che può essere prodotta. Pertanto, si sta anche studiando il modo per stabilizzare selettivamente l'mRNA in modo che non si degradi così velocemente.



mRNA  
Replacement

## Tecnologie di recupero del mRNA

**Vertex (VX-522)  
mRNA**

Inhaled CFTR mRNA: Lipid Nanoparticle  
Planned phase 1

**Arcturus (ARCT-032)  
mRNA**

Inhaled CFTR mRNA: Lipid Nanoparticle  
Late preclinical

**ReCode  
mRNA**

Inhaled CFTR mRNA: Lipid Nanoparticle  
Late preclinical



# RNA Therapy

- La terapia con acido ribonucleico (RNA) è un potenziale trattamento per pazienti con mutazioni “non sense” e rare che potrebbe anche **giovare a tutti i pazienti FC, indipendentemente dalla loro mutazione**

L'obiettivo consiste nel fornire il normale mRNA CFTR alle cellule che devono produrre la proteina CFTR

**Studio di fase 1, in aperto, per valutare l'attività di VX-522 in dose singola in aumento, in adulti FC  $\geq$  di 18 anni con mutazioni non rispondenti ai modulatori. (Vertex VX21-522-001 SAD) (1)**

Lo studio valuterà la sicurezza e la tollerabilità di un **RNA messaggero (mRNA)**, per **via inalatoria**, in adulti FC con mutazioni **non responsive** alla terapia con modulatori della CFTR.

L'obiettivo è fornire una copia a lunghezza intera del CFTR mRNA alle cellule polmonari utilizzando come vettore una **nanoparticella lipidica**. Le cellule polmonari userebbero quindi le istruzioni contenute nel mRNA per creare la proteina CFTR funzionale.

Studio di fase 1, in aperto, per valutare l'attività di VX-522 in dose singola in aumento, in adulti FC  $\geq$  di 18 anni con mutazioni non rispondenti ai modulatori. (Vertex VX21-522-001 SAD) (1)

**Questa terapia potrebbe funzionare per qualsiasi persona con FC, indipendentemente dalle sue mutazioni CFTR**

Lo studio è in aperto cioè **tutti i partecipanti riceveranno una dose di VX-522 e verranno seguiti per un follow-up di 24 settimane**. Saranno studiate dosi differenti di VX-522 somministrato per inalazione

Verranno valutate la **sicurezza** e la **tollerabilità** monitorando qualsiasi cambiamento nella salute dei partecipanti. Per lo studio potranno essere richiesti prelievi ematici, test di funzionalità respiratoria, elettrocardiogrammi e /o altri esami.

## Studio di fase 1 in aperto per valutare l'attività di VX-522 in adulti FC $\geq$ di 18 anni con mutazioni non rispondenti ai modulatori. (Vertex VX21-522-001 SAD)(2)

### **Criteria di eleggibilità**

I partecipanti dovranno avere **2 mutazioni CFTR non responsive** ai modulatori  
Non devono avere assunto modulatori nei 28 gg. precedenti lo studio  
Non devono avere partecipato ad altri studi con terapie con acidi nucleici (terapia genica , terapia basata su RNA) nei 12 mesi antecedenti  
l'arruolamento in questo studio

**Durata studio:** 6 mesi

**Inizio studio:** febbraio 2023

**Fine studio :** gennaio 2024

Studio di fase 1 in aperto per valutare l'attività di VX-522 in adulti FC  $\geq$  di 18 anni con mutazioni non rispondenti ai modulatori. (Vertex VX21-522-001 SAD)(2)

**Criteria chiave di inclusione:**

- Età 18-65 anni
- Indice di massa corporea (BMI)  $\geq$  18,0 e  $<$  30,0
- Peso corporeo  $>$  50 kg
- Malattia CF stabile
- Entrambi gli alleli con mutazioni del gene CFTR che non rispondono alla terapia con modulatore CFTR
- FEV1  $\geq$  40%

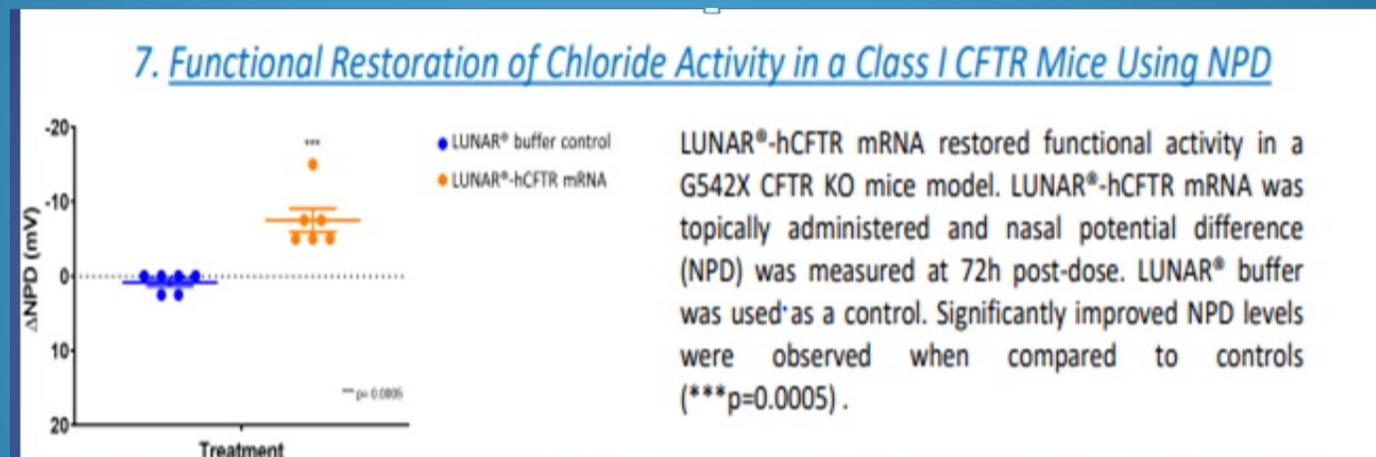
**Criteria chiave di esclusione:**

- Storia di asma incontrollata entro un anno prima dello screening
- Storia di trapianto di organo solido o ematologico
- Cirrosi epatica con ipertensione portale, compromissione epatica moderata o compromissione epatica grave (punteggio di Child Pugh da 10 a 15)
- Saturazione arteriosa di ossigeno nell'aria ambiente inferiore a ( $<$ ) 94% allo screening



## LUNAR<sup>®</sup>-CF, un nuovo approccio terapeutico con mRNA per correggere la malattia polmonare della fibrosi cistica

- LUNAR<sup>®</sup>-CF è una terapia sostitutiva dell'mRNA, per aerosol per il trattamento della malattia polmonare nella fibrosi cistica ed è **indipendente** dal genotipo.
- Un mRNA CFTR umano incapsulato in LUNAR<sup>®</sup>, **una nanoparticella lipidica**, è stato sviluppato per fornire l'mRNA nell'epitelio delle vie aeree. Le proprietà fisico-chimiche di LUNAR<sup>®</sup> erano stabili dopo l'aerosol. Le formulazioni LUNAR<sup>®</sup> che trasportano un mRNA sono state utilizzate per mostrare il coinvolgimento del bersaglio nell'epitelio delle vie aeree nei modelli animali di roditori (topo e ratto) e non roditori (furetto, primate non umano [NHP])





FIC  
Fondazione  
Italiana  
Fibrosi Cistica

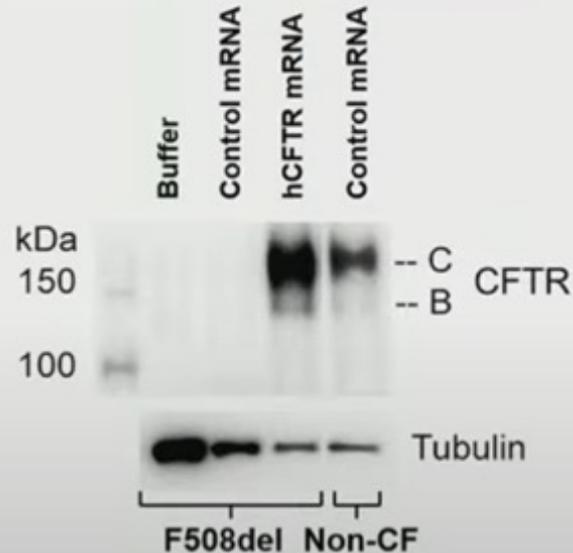
# LUNAR<sup>®</sup>-CF, un nuovo approccio terapeutico con mRNA per correggere la malattia polmonare della fibrosi cistica

mRNA Replacement

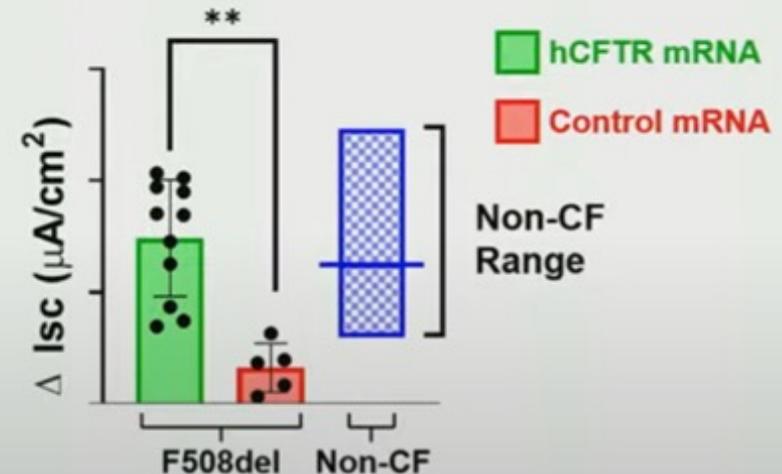
## LUNAR<sup>®</sup>-hCFTR mRNA (ARCT-032) Restores CFTR Expression & Function *in vitro*

Restoration of CFTR expression and function in CF hBE cells

High levels of mature CFTR protein



Restored chloride activity (chloride gradient)



Courtesy of Arcturus in collaboration with UAB CFRC and Javier Campos-Gomez

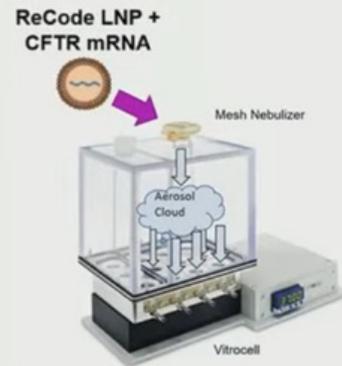
\*\*P<0.01; Data from two F508del donors; Ussing chamber studies performed with chloride secretory gradient



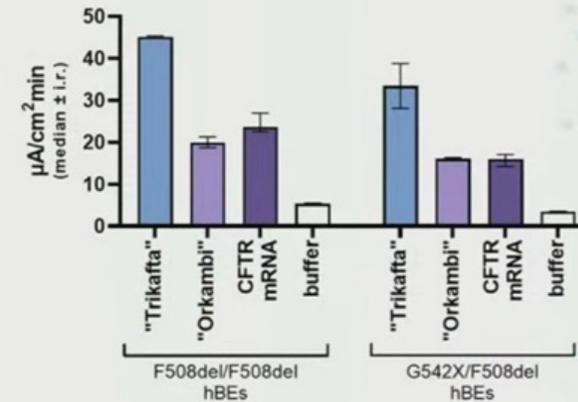
# ReCode mRNA

mRNA  
Replacement

## ReCode Data Indicate CFTR mRNA Can Be Delivered via Aerosol



CFTR mRNA nebulized  
on human bronchial  
epithelial (hBE) cells



Further optimization of the SORT LNP™ used above  
has led to increased potency across multiple CFTR  
genotypes as well as improved storage stability

\* "Trikafta" = VX-445 + VX-661 + VX-770; "Orkambi" = VX-809 + VX-770

Courtesy of ReCode

La funzione della proteina CFTR è migliorata nelle cellule polmonari trattate che avevano 2 mutazioni F508del e cellule con 1 mutazione F508del e 1 G542X. Il miglioramento della funzione era uguale a quello visto con la combinazione di 2 modulatori (Orkambi) nelle cellule con 2 F508del



# Barriere alle terapie con Acidi Nucleici

- FC è una malattia multiorgano
- Via di somministrazione: sistemica vs aerosolica  
quando somministrato x aerosol si muove nel muco  
denso e vischioso
- Target cellulare specifico : cellule progenitrici
- Dosaggio ripetuto e risposta immunitaria



AIC  
Associazione Italiana  
Fibrosi Cistica

# RNA Therapy

## The Promise of Antisense Oligonucleotides for the Treatment of Cystic Fibrosis



# La Terapia con Oligonucleotidi antisenso

La terapia con oligonucleotidi antisenso (ASO) ha l'obiettivo di correggere gli effetti di mutazioni rare, come le mutazioni di **splicing**, che interrompono la produzione di RNA messaggero (mRNA).

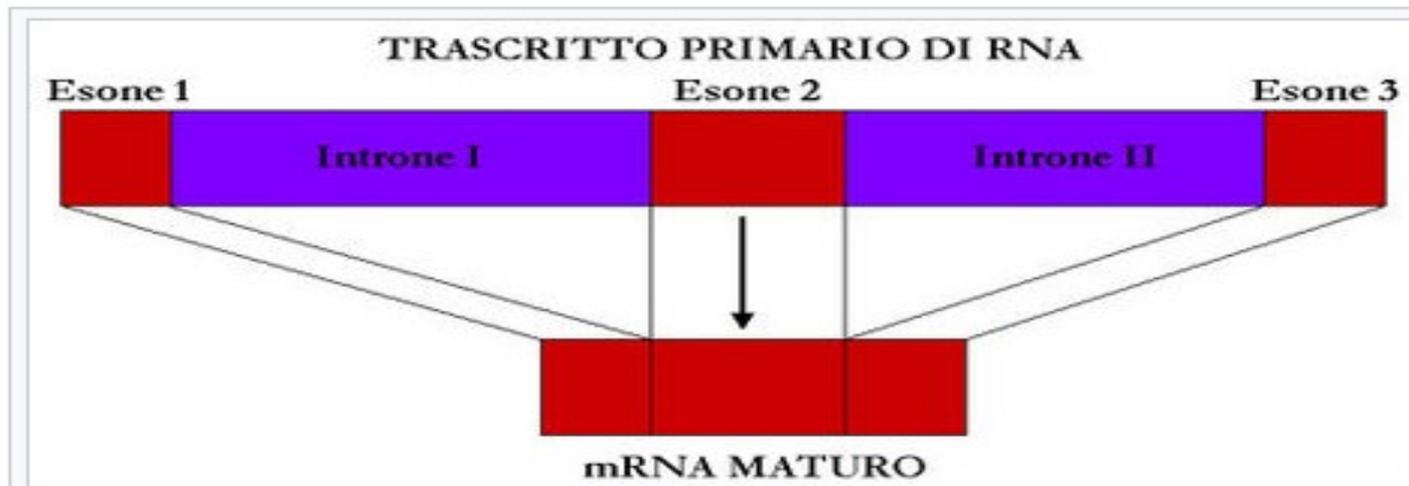
Poiché l'mRNA è necessario per produrre proteine CFTR, le mutazioni di splicing bloccano la sintesi delle normali proteine CFTR.

Una mutazione di splicing si verifica quando c'è un'alterazione nella sequenza del DNA che cambia le istruzioni necessarie per generare correttamente l'mRNA.

# RNA Splicing

Lo splicing è un passaggio fondamentale tra la trascrizione e la traslazione della proteina. I nostri geni contengono delle informazioni che non sono necessarie per la proteina. Queste informazioni devono essere rimosse prima che il passaggio abbia luogo, altrimenti il passaggio non avrà nessun senso per la proteina e questa non verrà creata.

Con lo splicing vengono rimosse le parti che non servono da Pre-mRNA a mRNA. Le mutazioni dei geni possono alterare lo splicing dell'mRNA perché nello splicing possono essere conservate informazioni extra che portano ad un meccanismo che non è corretto.



Esoni e introni. L'mRNA maturo è formato dai soli esoni.





## La Terapia con Oligonucleotidi antisenso

Gli ASO sono piccoli pezzi di DNA o RNA che si legano alla molecola di RNA e correggono queste istruzioni in modo da poter produrre una proteina CFTR a lunghezza intera.

Gli oligonucleotidi, compresi gli ASO, forniscono un potenziale approccio terapeutico per diversi tipi di mutazioni CFTR e sono già utilizzati nel trattamento dell'atrofia muscolare spinale, alcune forme di distrofia muscolare e altre malattie genetiche.

## Oligonucleotidi antisenso «Exon-skipping»

La mutazione senza senso (stop) CFTR-W1282X causa una forma grave di CF. Tuttavia manca una terapia mirata per i pazienti con la mutazione W1282X. La proteina CFTR-W1282X ha un'attività residua ma è espressa a un livello molto basso a causa del decadimento dell'RNA messaggero (mRNA) mediato da mutazione non sense (NMD)\*.

\**Non-sense Mediated mRNA Decay*, degradazione mediata da RNA nonsense

**Exon-skipping antisense oligonucleotides for cystic fibrosis therapy** Kim YJ, Sivetz N, Layne J, Voss DM, Yang L, Zhang Q, Krainer AR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022 Jan 18;119(3)

## Oligonucleotidi antisenso «Exon-skipping»

La ricerca per le mutazioni non sense è focalizzata su:

- **la soppressione dell'NMD**
- **la terapia read-through**

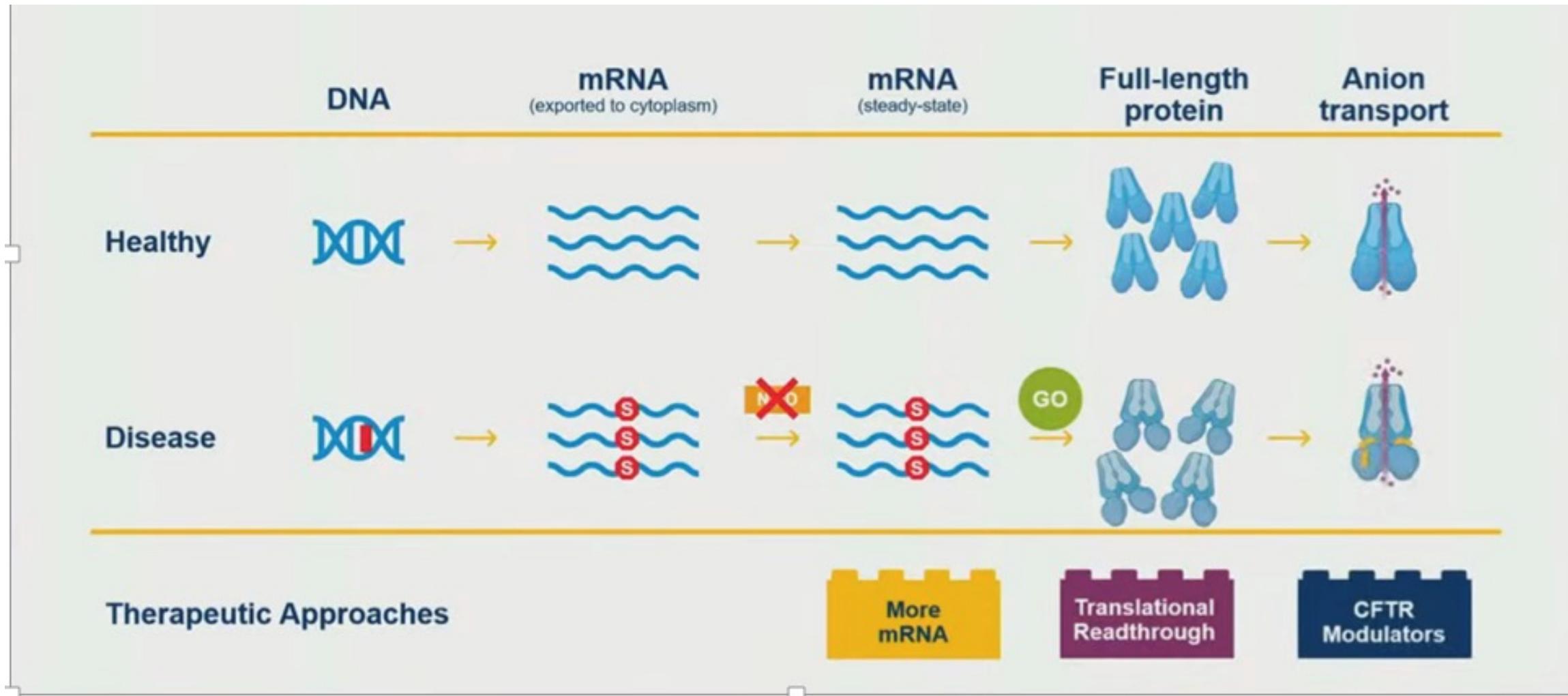
La soppressione dell'NMD potrebbe **umentare l'mRNA** del CFTR mutato e le terapie read-through potrebbero **umentare i livelli della proteina CFTR** a lunghezza intera.

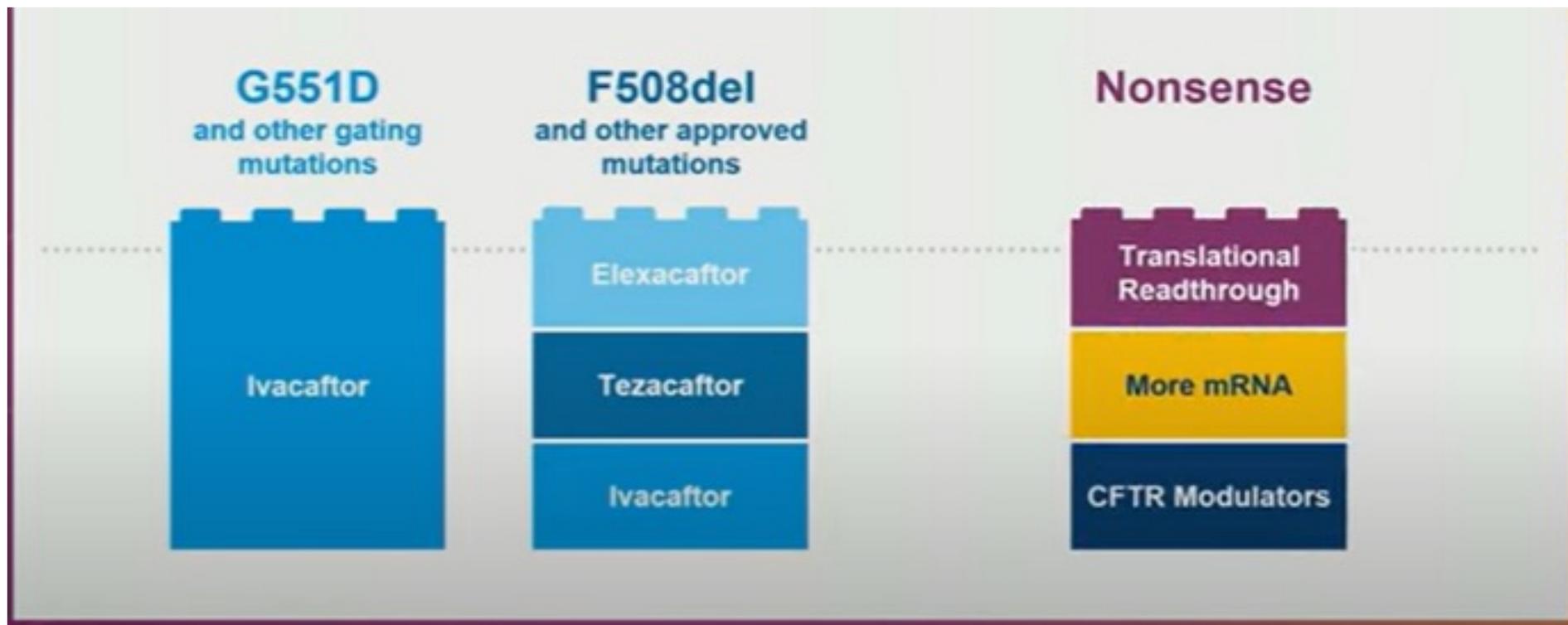
*Tuttavia, questi approcci hanno limitazioni e potenziali effetti collaterali: poiché il meccanismo NMD regola anche l'espressione di molti mRNA normali*

## Oligonucleotidi antisenso «Exon-skipping»

- Per risolvere questi problemi, si sono usati oligonucleotidi antisenso (ASO) per saltare l'esone e ottenere l'evasione NMD specifica del gene.
- Un cocktail di due ASO mirati al sito di giunzione ha indotto l'espressione dell'mRNA CFTR senza l'esone 23 contenente il codone di stop (CFTR- $\Delta$ ex23).
- Il trattamento delle cellule epiteliali bronchiali umane con questo cocktail di ASO che mirano ai siti di giunzione, si traduce in un efficiente salto dell'esone 23 e in un aumento della proteina CFTR- $\Delta$ ex23
- I risultati ottenuti hanno posto le basi per lo sviluppo di una terapia allele-specifica per la FC causata dalla mutazione W1282X. **La proteina CFTR che ne deriva è più piccola, poiché perde una intera sequenza esonica (D23 o D24).** Tuttavia, la proteina modificata **rimane parzialmente responsiva agli attuali modulatori (Kaftrio).**

# Approcci per aumentare gli effetti benefici della lettura traslazionale





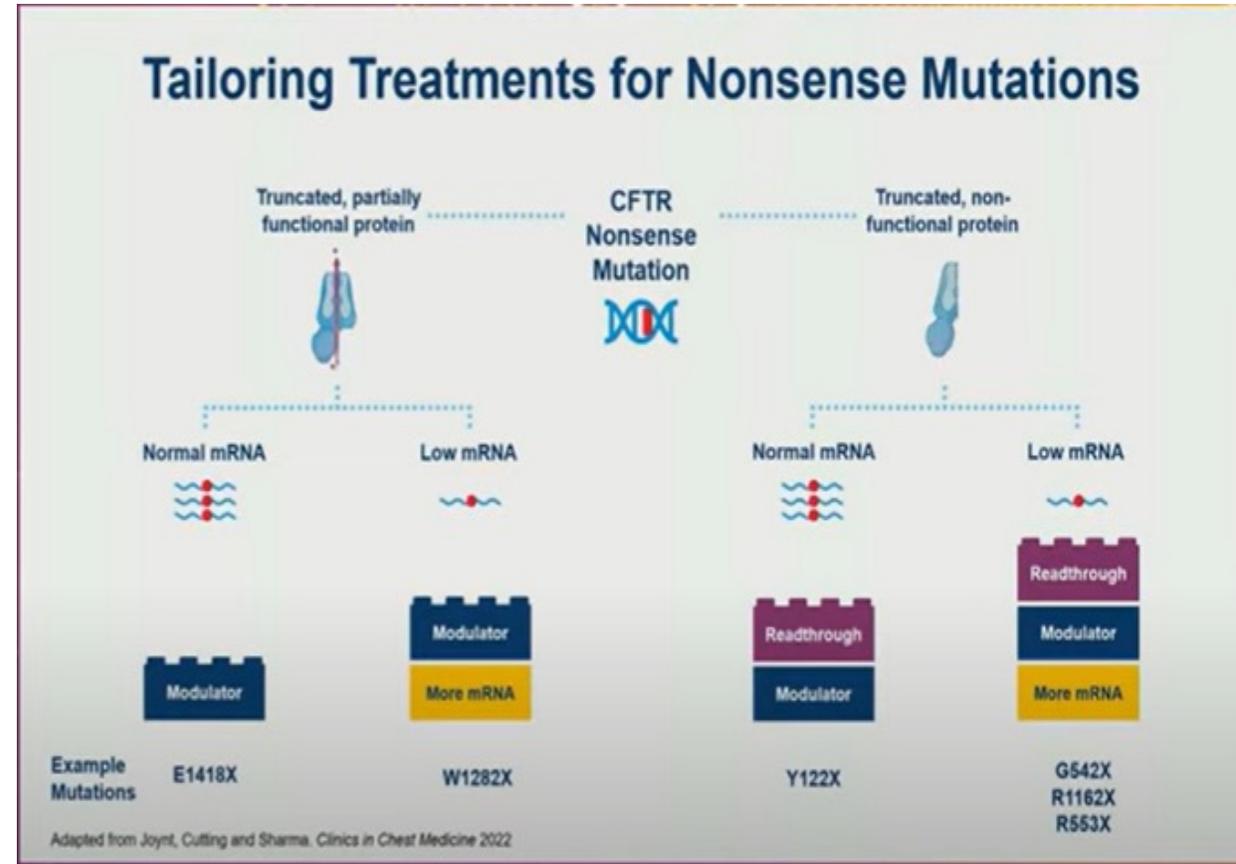
## La correzione delle mutazioni non sense costituisce un obiettivo terapeutico sfida ma ancora non raggiunto

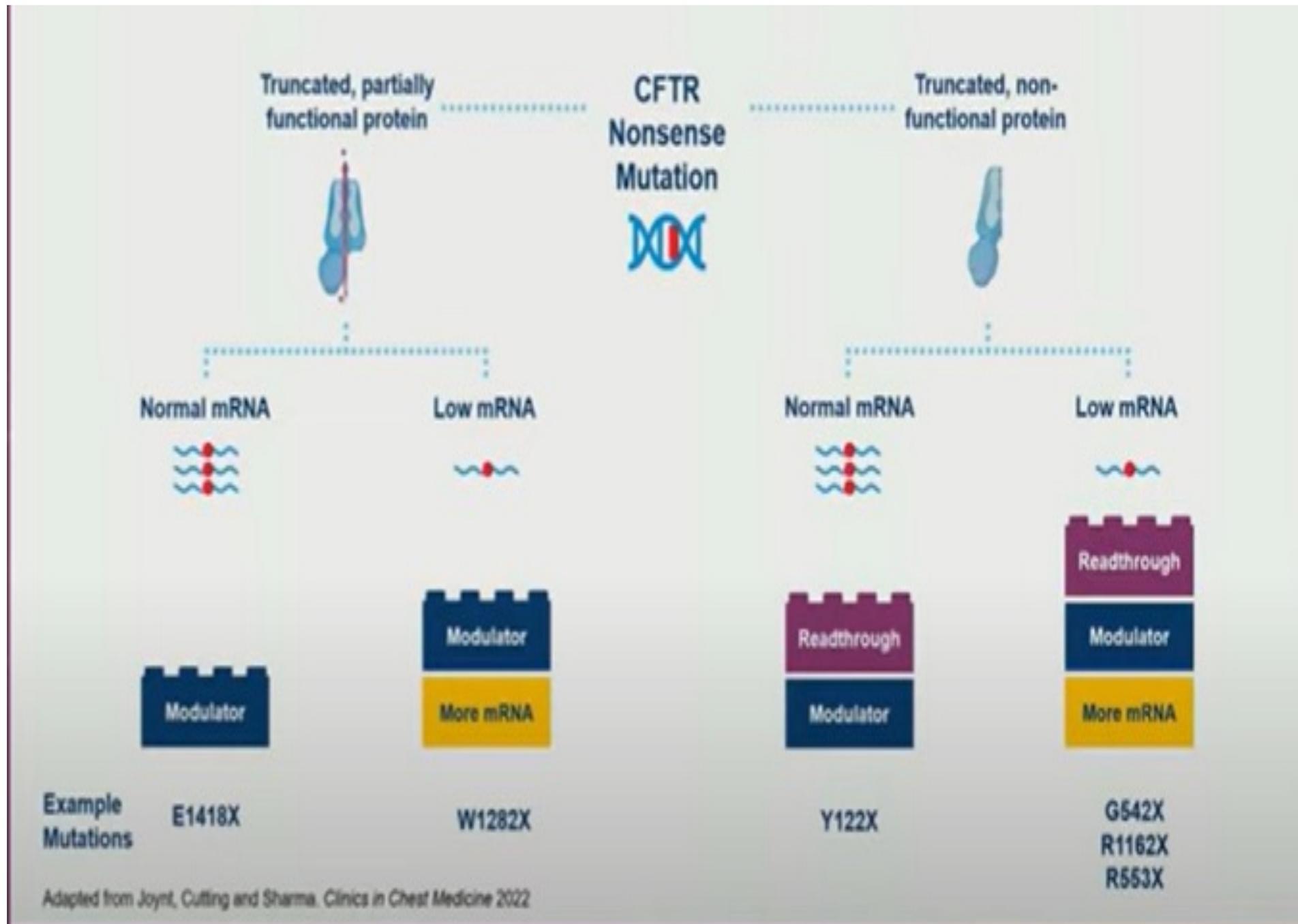
Possiamo immaginare le terapie come dei mattoncini LEGO, che montiamo piano piano uno sull'altro per raggiungere benefici sempre maggiori

## MA:

le mutazioni nonsense **non** sono tutte uguali:

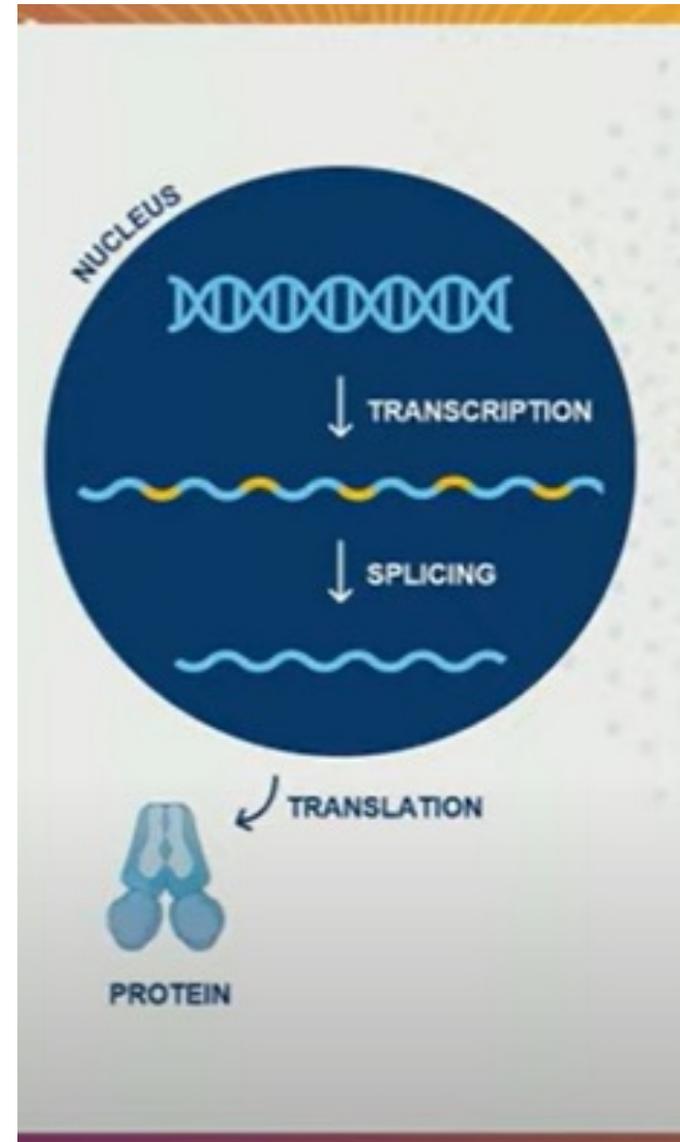
- alcune portano alla produzione di **normali** livelli di mRNA con proteina troncata **parzialmente funzionante**,
- altre a **bassi** livelli di proteina troncata **parzialmente funzionante**,
- altre mutazioni portano a livelli di **mRNA normali** o **bassi** ma proteina **non funzionante**.
- **Dunque gli approcci terapeutici saranno diversi a secondo del tipo di mutazione non sense**



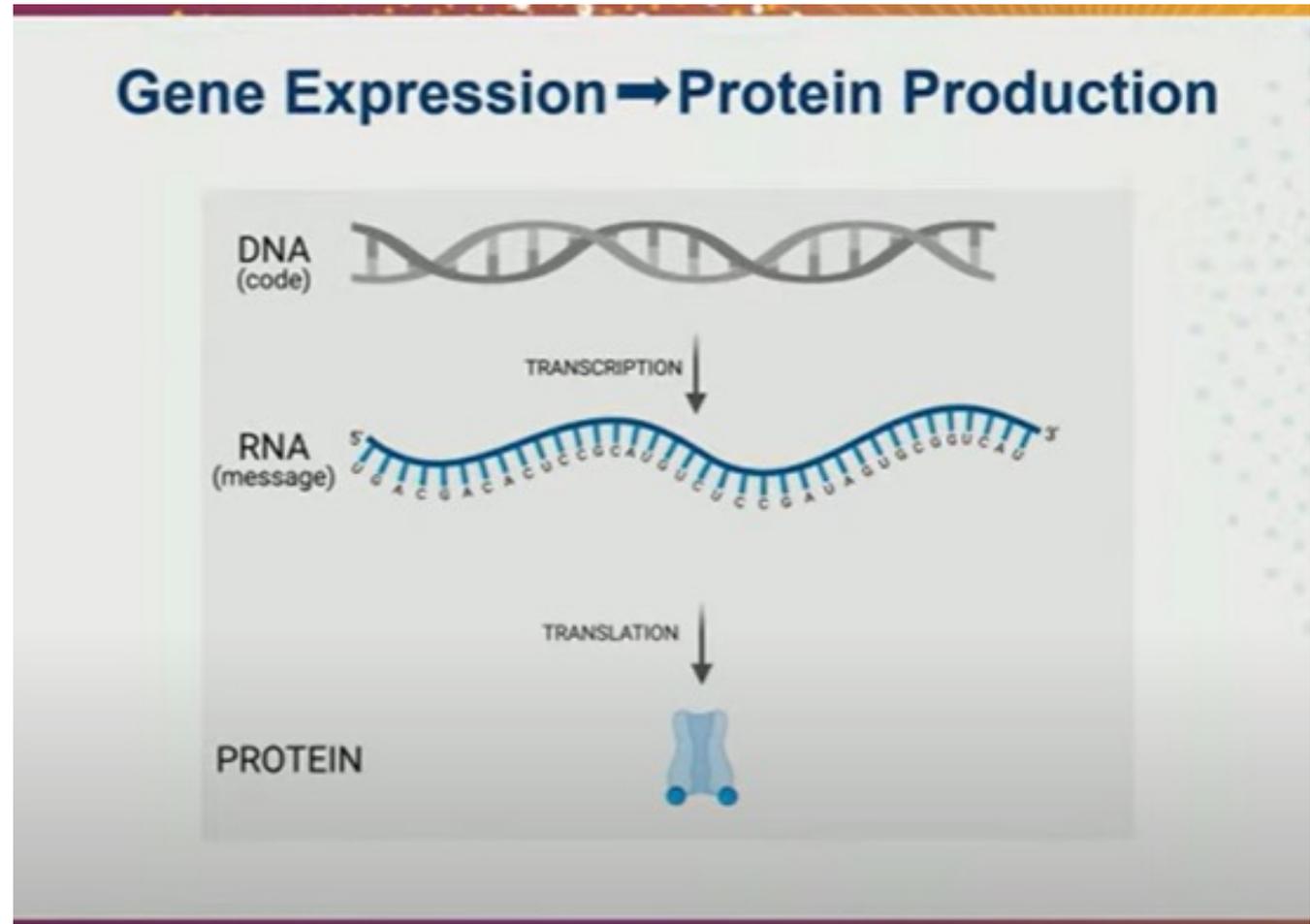


TERAPIA PERSONALIZZATA

# Oligonucleotidi antisense modulatori dello splicing (ASO) per recuperare mRNA



Il gene CFTR è codificato nel DNA che è composto da due stringhe di nucleo avvolte in doppia elica. Quando le cellule hanno bisogno della proteina CFTR, il DNA fa una copia di sé stesso nella forma di RNA, una sorta di memoria temporanea che è traslata nella proteina. L'ASO (Antisense Oligonucleotide) è disegnato per inserirsi in ogni spazio dell'RNA in modo complementare a seconda della sequenza.





## **Come può l'ASO modificare questo processo?**

Si può intervenire cercando di mascherare quel pezzetto di mutazione e tagliare la sequenza corretta.

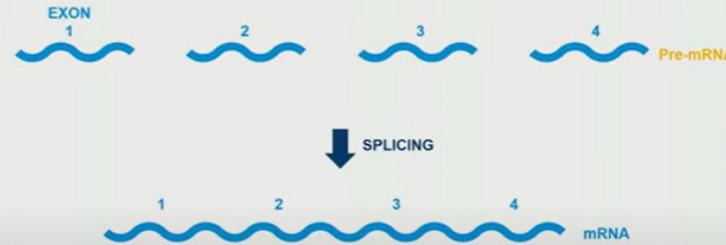
## **Come lo applichiamo alla FC?**

Si crea un ASO specifico per quella sequenza che blocca lo splicing e permette di creare la proteina corretta. I risultati al momento danno buone speranze a breve cominceranno dei trial clinici specifici.

RNA splicing è cruciale per la corretta espressione del gene



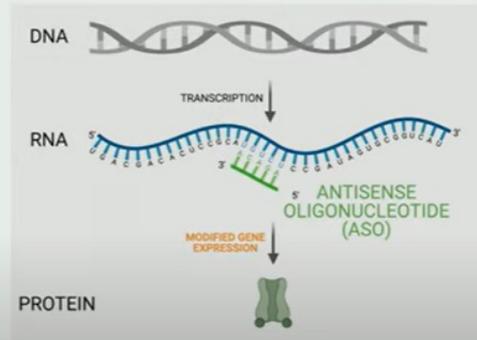
RNA splicing è cruciale per la corretta espressione del gene



Le mutazioni del gene possono alterare RNA splicing



Nucleotidi antisense ( ASO)



Come può l'ASO modificare questo processo?

Si può intervenire cercando di mascherare quel pezzetto di mutazione e tagliare la sequenza corretta.

Come lo applichiamo alla FC?

Si crea un ASO specifico per quella sequenza che blocca lo splicing e permette di creare la proteina corretta. I risultati al momento danno buone speranze a breve cominceranno dei trial clinici specifici.

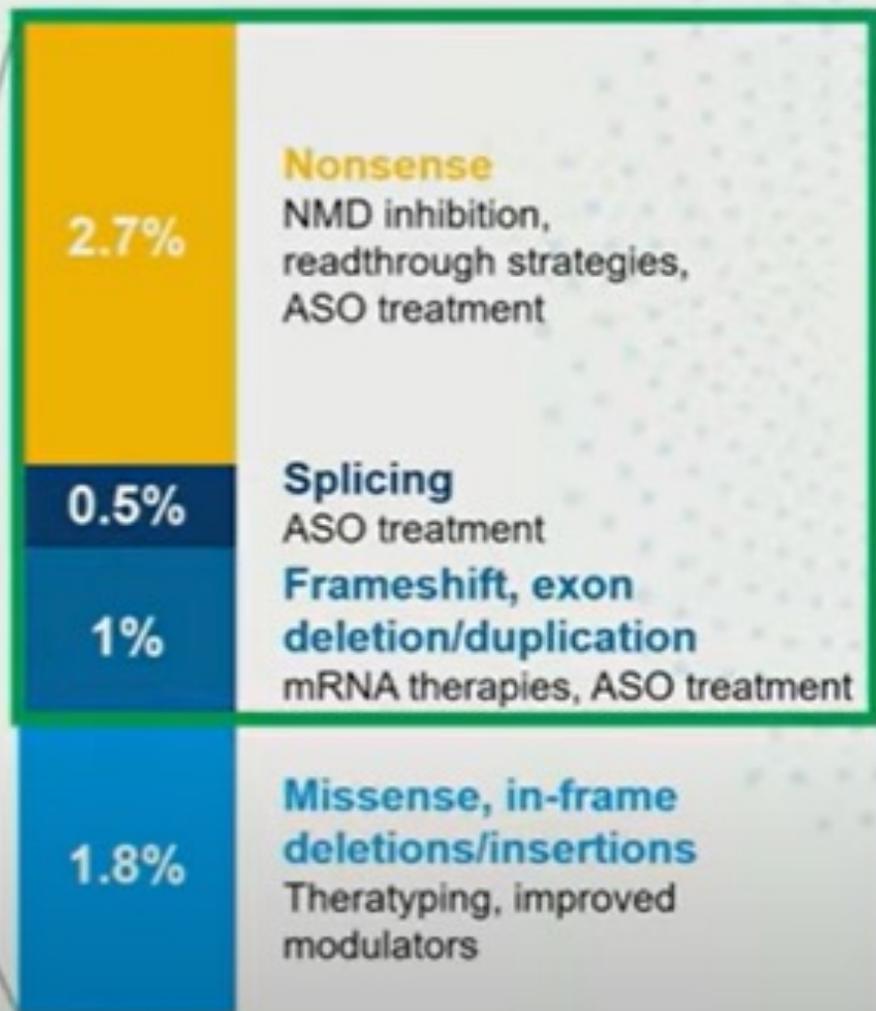


Nel Mondo circa il 94% dei pz FC può beneficiare dei modulatori altamente efficaci della CFTR

In Italia però solo il  
70% circa

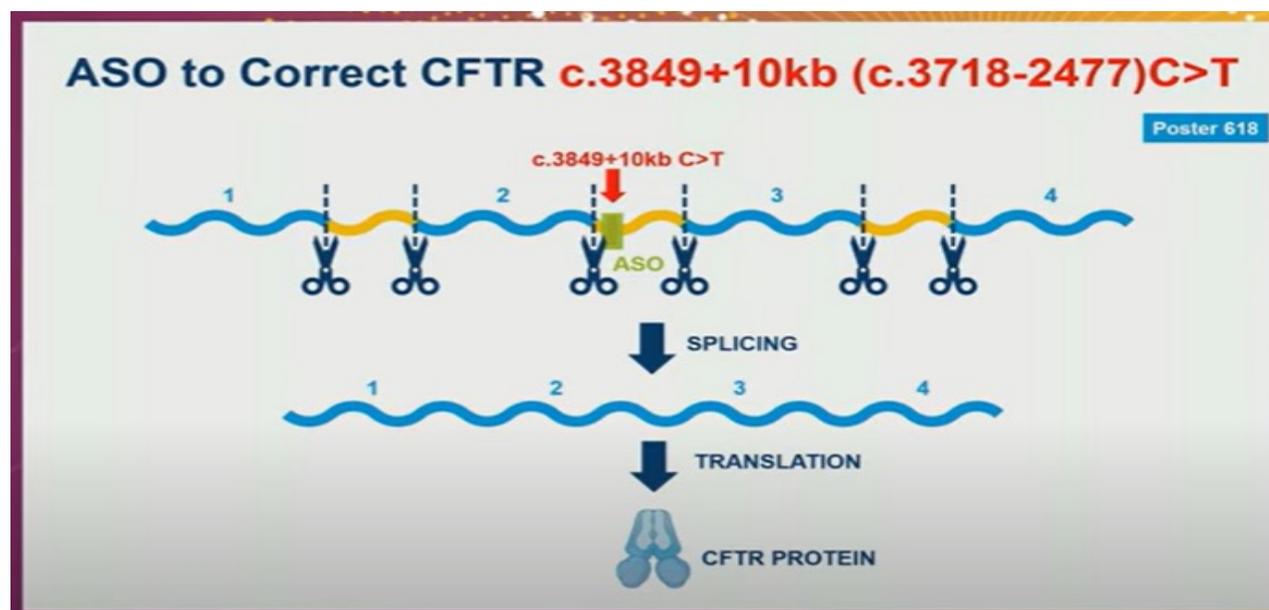
94%  
F508del or other  
approved mutation  
combination

Data provided by Dr. Garry Cutting and Karen Raraigh,  
CFTR2, US and Other Countries, Johns Hopkins University

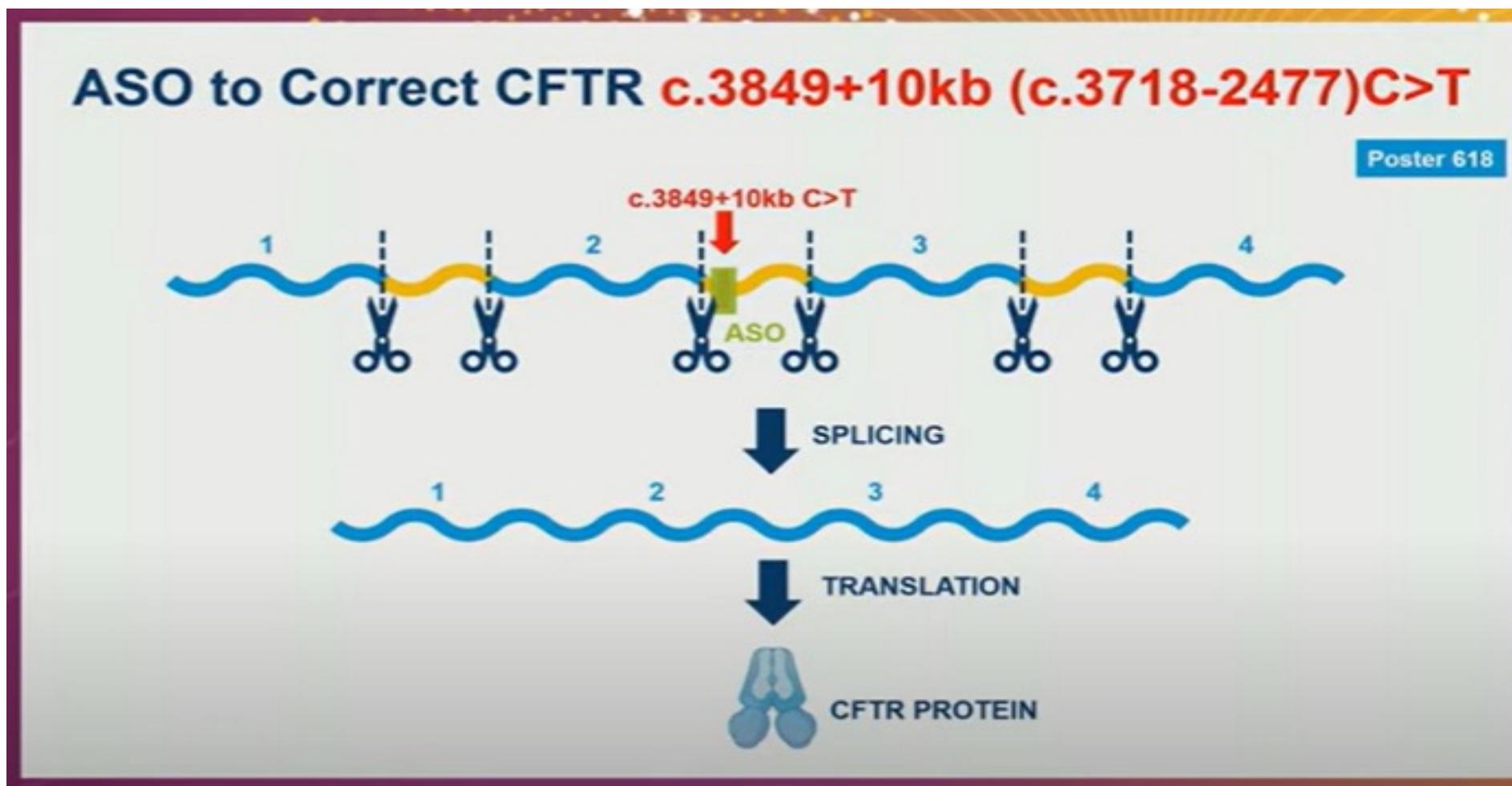


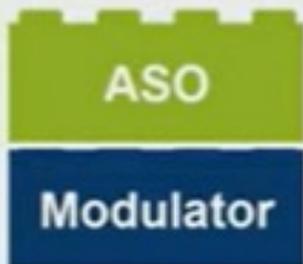
# Esempio di mutazione di splicing corretta con ASO

La mutazione 3849+10 kb C->T porta a uno specifico difetto di splicing nel CFTR, con conseguente inclusione di 84 nucleotidi intronici come esone criptico nell'RNA del CFTR. Questo esone criptico contiene un codone di stop prematuro, che porta alla degradazione di una frazione significativa dell'RNA mediante il decadimento dell'mRNA mediato da NMD meccanismo, nonché alla produzione di proteina CFTR troncata non funzionale.



# Esempio di mutazione di splicing corretta con ASO

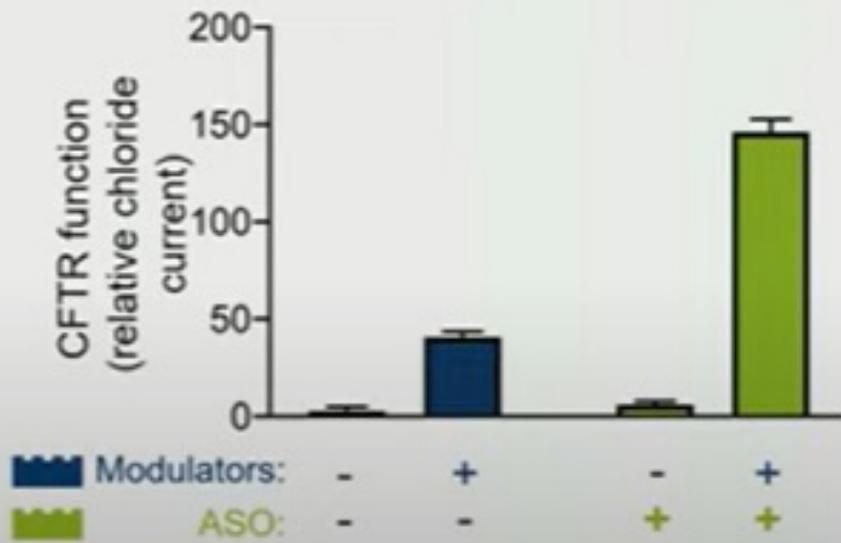




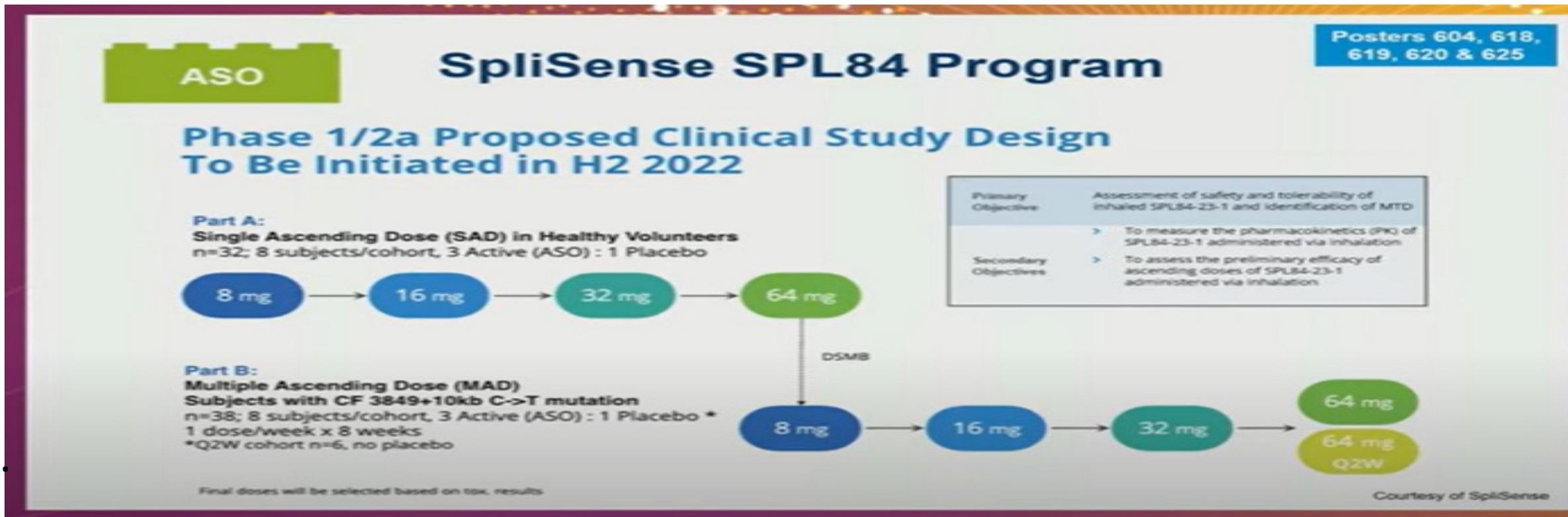
# ASO + Modulators Rescue CFTR W1282X Function

Posters 619 &  
638

Recovery of Chloride Current in Patient-Derived Bronchial Epithelial Cells



Sebbene i modulatori CFTR siano approvati per i pazienti portatori della mutazione 3849+10kb negli Stati Uniti, il loro effetto è minimo. Nell'UE, a causa della mancanza di efficacia, nessun farmaco modulatore CFTR è approvato per i pazienti con questa mutazione.



## Soluzione SpliSense

ASO SPL84, somministrato tramite inalazione, penetra efficacemente nelle cellule bersaglio nei polmoni e si lega specificamente alla regione bersaglio, impedendo così l'inclusione di 84 nucleotidi intronici come esone criptico e generando una proteina CFTR completamente funzionante.

# Altre mutazioni di Splicing candidate al trattamento con ASO

## Examples of other potential candidates for ASO approach:

c.273+3A>C  
c.579+5G>A  
c.579+3A>G  
c.1525-42G>A  
c.1585-8G>A  
c.1680-886A>G  
c.1680-13C>G  
c.1766+3A>G  
c.1766+5G>T

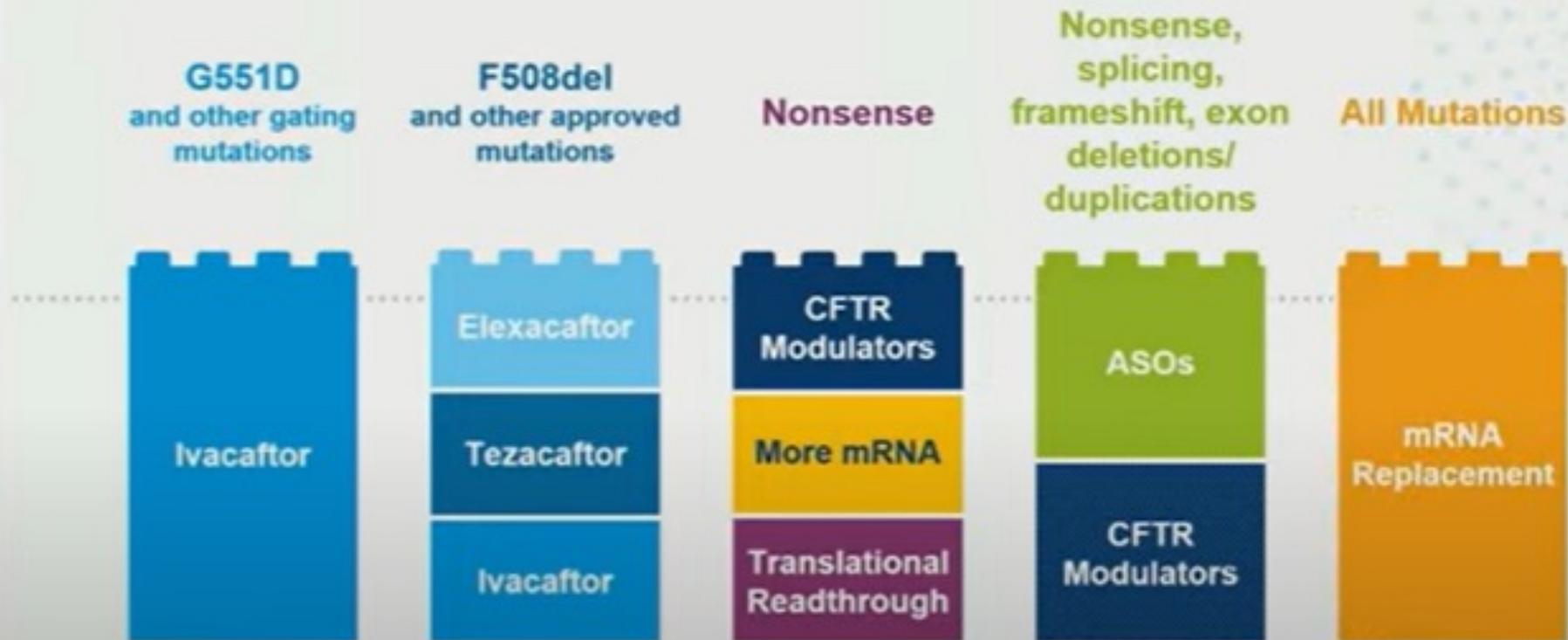
c.2620-26A>G  
**c.2657+5G>A**  
c.3140-26A>G  
c.3468+2dupT  
c.3468+5G>A  
c.3717+4A>G  
c.3717+5G>A  
c.3718-3T>G  
+++

Igreja et al., Hum. Mutat. 2015 (Amaral group)

Poster 615 (Kerem group)



## mRNA Replacement Could Restore CFTR Function for Any Mutation





## More Than 5 Clinical Genetic Therapy Trials Planned or Under Review in 2022

