



ORGANIZZAZIONE SINDROME DI ANGELMAN

Via Bressa n° 8 31100 TREVISO

Tel. 0422411132 Fax.0422319571

C.F.94047800266

<http://www.sindromediangelman.org>

Email: [orsa@sindromediangelman.org](mailto:orsa@sindromediangelman.org)



Carissimi, come già anticipato Vi invio gli abstract delle relazioni presentate ad Amburgo in occasione della 6 conferenza internazionale ASA tradotti in italiano.

Siccome alcuni ricercatori, erano già stati precedentemente al nostro convegno di Assisi e poi a quello di Amburgo, presentando la stessa relazione e gli stessi dati, per semplificare ve li presentiamo una sola volta.

Grazie alla disponibilità della dott.ssa Ilaria Tonazzini che ringrazio affettuosamente, in allegato, c'è anche una sintesi degli argomenti trattati redatta con una terminologia e linguaggio più semplice, in modo da permettere a tutti di comprendere dove è arrivata la ricerca scientifica e cosa possiamo sperare nel prossimo futuro.

***Note semplificate dalla conferenza ASA (Amburgo- Ottobre 2018) per le famiglie di pazienti con Sindrome di Angeman a cura della dott.ssa Ilaria Tonazzini.***

I maggiori gruppi di ricerca e aziende che lavorano sulla Sindrome di Angelman erano presenti.

Il Prof. Elgersma ha presentato importanti risultati riguardo la localizzazione e quindi la funzione delle diverse forme di UBE3A nei neuroni. Questo lavoro è importante per chiarire completamente il ruolo di UBE3A nel cervello, e quindi per far luce su cosa succede quando manca.

Il Prof. Distel ha presentato un importante lavoro sull'utilizzo e la caratterizzazione dei test comportamentali su animali modello della Sindrome di Angelman. Questo lavoro è importante per avere a disposizione dei test validi e affidabili per testare sugli animali eventuali trattamenti terapeutici per la SA. Inoltre sono stati presentati recenti risultati che mostrano che la funzione più importante di UBE3A è quella nel nucleo (i.e. il centro operativo della cellula).

Su una linea simile lavora il Prof. Philpot, che sta mettendo a punto dei protocolli di elettroencefalogramma nei topi affetti da SA, con l'intento di avere a disposizione delle misure efficaci per valutare futuri trattamenti per la sindrome.

La Dott.ssa Chamberlein sta sviluppando neuroni umani malati di Angelman, insieme ai corrispettivi controlli sani, in modo che siano identici in tutto e per tutto eccetto che nel gene Ube3a che causa la SA. Si parla di cellule neuronali inducibili, che si ottengono partendo da cellule del sangue di pazienti. Questo lavoro è importante per avere modelli umani di neuroni con la SA da utilizzare per test in laboratorio (sempre per avere uno strumento per valutare eventuali trattamenti terapeutici per la SA).

A Milano, la Dott.ssa Russo e la Prof.ssa Borsello stanno portando avanti un progetto di ricerca per valutare gli effetti di un peptide in modelli murini e in modelli di neuroni umani malati di Angelman. Questo lavoro indaga i meccanismi molecolari di stress attivati nell'AS, da utilizzare come possibile target terapeutico in futuro per migliorare il funzionamento neuronale nella sindrome.



ORGANIZZAZIONE SINDROME DI ANGELMAN

Via Bressa n° 8 31100 TREVISO

Tel. 0422411132 Fax.0422319571

C.F.94047800266

<http://www.sindromediangelman.org>

Email: [orsa@sindromediangelman.org](mailto:orsa@sindromediangelman.org)



Questi sono gli aggiornamenti più importanti sul lato della ricerca scientifica, non ancora maturi per dare dei risvolti immediati nella vita dei pazienti, ma che potranno aprire prospettive terapeutiche nel prossimo futuro.

Gli aggiornamenti più importanti a livello di possibili terapie disponibili a breve sono stati quelli di due ditte americane, della OVID e della Ionis.

La Ovid ha presentato i risultati (parziali) sulla sperimentazione dell'OV101, un farmaco che rinforza l'inibizione sinaptica gabaergica (ridotta nella SA). In data successiva, come annunciato ad Amburgo, la Ovid ha poi rilasciato i risultati completi della sperimentazione. Risultati finali del primo trial clinico di OV101: La somministrazione più efficace si è rivelata quella di 15 mg- 1 volta al giorno (di sera). Le conclusioni più importanti della loro sperimentazione su adulti e adolescenti mostrano che: - il farmaco è sicuro, ben tollerato dai pazienti e non ha effetti tossici; - in dettaglio, il farmaco ha mostrato effetti positivi sull'induzione del sonno e sulle capacità motorie complessive (non sulla mobilità fine); - i risultati sul sonno e sul movimento non sono eclatanti a livello statistico, ma ci sono alcuni miglioramenti: in generale sembra che i maggiori miglioramenti ci siano stati laddove c'erano pazienti con maggiori problemi (nb: infatti ci si aspetta che i pazienti con delezione possano beneficiarne maggiormente- considerato il lavoro del Dott. Egawa).

La Ionis sta mettendo a punto una terapia basata su Oligonucleotidi antisenso (ASO) per la SA. Non si sono sbilanciati mostrando i dettagli della loro sperimentazione ma hanno detto di avere buoni risultati preclinici e sono più che fiduciosi circa la possibilità di entrare in sperimentazione clinica nel giro di un paio di anni (n.b: sono già in contatto con le agenzie governative di controllo sui farmaci). Questo approccio sulla carta è ad oggi la possibilità più promettente (in termini sia funzionali che temporali) per una terapia per i pazienti con la sindrome di Angelman.

Ilaria Tonazzini, Erasmus MC, Rotterdam (NL)

Email: [ilaria.tonazzini@sns.it](mailto:ilaria.tonazzini@sns.it) - per eventuali domande Facebook: @Neuroguide @neuroguide2018)



ORGANIZZAZIONE SINDROME DI ANGELMAN

Via Bressa n° 8 31100 TREVISO

Tel. 0422411132 Fax.0422319571

C.F.94047800266

<http://www.sindromediangelman.org>

Email: [orsa@sindromediangelman.org](mailto:orsa@sindromediangelman.org)



### **Ype Elgersma, Dottorato di ricerca**

Professore di Neuroscienze Molecolari

Direttore scientifico di ENCORE Expertise

Centro per Disturbi dello Sviluppo Neurologico

Dipartimento di Neuroscienze,

Erasmus MC, Paesi Bassi

### **Rossella Avagliano Trezza**

#### **Meccanismi molecolari alla base della SA e ricerca sulle opzioni terapeutiche**

Le mutazioni associate alla Sindrome di Angelman rivelano il meccanismo e l'importanza del targeting nucleare di UBE3A. Le mutazioni che colpiscono l'ubiquitina-ligasi UBE3A sono causa della Sindrome di Angelman. Sebbene la maggior parte degli studi si concentri sulla funzione sinaptica di UBE3A, noi dimostriamo che UBE3A è altamente arricchito nel nucleo nei neuroni murini e umani. Abbiamo scoperto che la distribuzione differenziata di UBE3A è determinata dall'espressione delle due diverse isoforme, entrambe sottoposte all'importazione nucleare attraverso il legame diretto con PMSD4/RPN10. Abbiamo identificato l'estremità N-terminale dell'isoforma citoplasmatica come la causa principale della ritenzione nel nucleo. Infine, abbiamo scoperto che alcune mutazioni missenso di UBE3A, associate alla SA, annullano la localizzazione nucleare, sia colpendo il legame con PMSD4/RPN10, sia perdendo la capacità di essere trattenuate nel nucleo. Se considerate insieme, le nostre scoperte spiegano il meccanismo alla base delle localizzazioni subcellulari di UBE3A e indicano un funzionamento anomalo di UBE3A nel nucleo nel normale sviluppo neurologico.

### **Stormy J. Chamberlain**

Presidente, Comitato Scientifico Consultivo

Fondazione Sindrome di Angelman, Inc.

Dipartimento di Genetica e Scienze Genomiche

UConn Health, USA

#### **Fenotipi cellulari di persone con SA derivante da iPSC**

Abbiamo utilizzato la tecnologia CRISPR/Cas9 per generare coppie di cellule staminali pluripotenti, alcune con Sindrome di Angelman (SA) e altre controllo che sonogeneticamente identiche. Per raggiungere questo obiettivo, abbiamo corretto geneticamente una mutazione puntiforme che causa la SA in cellule staminali pluripotenti indotte derivanti dal paziente e abbiamo eliminato l'UBE3A materno nelle cellule staminali embrionali dell'uomo.



ORGANIZZAZIONE SINDROME DI ANGELMAN

Via Bressa n° 8 31100 TREVISO

Tel. 0422411132 Fax.0422319571

C.F.94047800266

<http://www.sindromediangelman.org>

Email: [orsa@sindromediangelman.org](mailto:orsa@sindromediangelman.org)



Abbiamo differenziato queste cellule staminali umane in colture di neuroni corticali del proencefalo e abbiamo analizzato i loro fenotipi cellulari. Abbiamo scoperto che questi neuroni SA hanno una maturazione RITardata e altri fenotipi fisiologici riportati precedentemente. Abbiamo, inoltre, scoperto che i neuroni SA hanno ridotta densità delle spine dendritiche, dimensioni più piccole delle cellule e ramificazioni meno complesse. Infine, abbiamo eseguito mRNA-seq su queste coppie isogeniche di neuroni per identificare una serie di trascritti che possono essere usati per distinguere facilmente SA dai neuroni neurotipici. Questi fenotipi cellulari saranno utili per determinare se le mutazioni specifiche di UBE3A siano probabili cause della SA e se eventuali approcci terapeutici possano ripristinare con successo la funzione neuronale.

### **Ben Distel, Dottorato di ricerca**

Dipartimento di Medicina Biochimica, AMC e Dipartimento di Neuroscienze

Erasmus MC, Paesi Bassi

### **Monica Sonzogni per Ben Distel**

[Una batteria di test comportamentali su topi modello della Sindrome di Angelman: un potente strumento per testare farmaci e nuovi mutanti di UBE3A](#)

La Sindrome di Angelman (SA) è un disturbo dello sviluppo neurologico caratterizzato da diverse incapacità intellettuali e ritardo nello sviluppo, dovuta a una mutazione genetica che colpisce la ligasi UBE3A. I lavori precedenti hanno mostrato che le due isoforme proteiche dei topi, UBE3A-Iso2 e UBE3A-Iso3, hanno localizzazioni diverse nei neuroni maturi, rivelando una funzione cellulare diversa. Stabilire l'importanza di queste isoforme di UBE3A, così come lo sviluppo di terapie, dipende molto dalla capacità di trovare fenotipi affidabili e, preferibilmente, clinicamente rilevanti. Abbiamo precedentemente descritto un numero di paradigmi comportamentali che valutano i fenotipi nei domini di performance motoria, comportamento ripetitivo, ansia e suscettibilità alle crisi. Qui valutiamo la robustezza di questi fenotipi testati in una batteria di test standardizzata e utilizziamo questi test per rivelare come le due isoforme di UBE3A contribuiscano ai fenotipi SA. Combinando i dati di otto esperimenti indipendenti, abbiamo determinato il potere statistico dei test comportamentali. Abbiamo, inoltre, valutato la robustezza di questi fenotipi, confrontando i topi mutanti di UBE3A in diversi background genetici e in linee mutanti di UBE3A derivate in modo indipendente. Abbiamo, quindi, definito le isoforme specifiche di UBE3A nelle linee cellulari del topo che esprimono sia UBE3A-Iso2 che UBE3A-Iso3 per comprendere il contributo delle isoforme di UBE3A allo sviluppo dei fenotipi SA. Abbiamo scoperto che la batteria di test è robusta tra diverse topi mutanti di UBE3A, ma conferma ed estende studi precedenti secondo cui diversi fenotipi sono molto sensibili al background genetico. Non abbiamo riscontrato deficit comportamentali nei topi che esprimono l'isoforma di UBE3A iso3 nel nucleo, mentre i topi UBE3A-Iso2 hanno mostrato tutti i fenotipi di topi con SA. Se considerate insieme, queste scoperte indicano che la batteria di test può



ORGANIZZAZIONE SINDROME DI ANGELMAN

Via Bressa n° 8 31100 TREVISO

Tel. 0422411132 Fax.0422319571

C.F.94047800266

<http://www.sindromediangelman.org>

Email: [orsa@sindromediangelman.org](mailto:orsa@sindromediangelman.org)



essere impiegata per studiare l'effetto di specifiche mutazioni di UBE3A su questi fenotipi e che l'espressione della sola isoforma nucleare mUBE3A-Iso3 è sufficiente per prevenire lo sviluppo dei fenotipi SA. Al contrario, i topi che hanno espresso solo la proteina citosolica mubE3A-Iso2 hanno sviluppato tutti i fenotipi SA. Questi risultati implicano che la funzione più importante di UBE3A sia nel nucleo e che l'UBE3A citosolico è superfluo per il normale sviluppo cerebrale.

**Silvia Russo, Dottorato di ricerca,**

IRCCS Laboratorio Citogenetico e Genetica Molecolare,

Istituto Auxologico Italiano

Milano, Italia

Poteniale approccio terapeutico per il deficit sinaptico nella sindrome di Angelman: il peptide dell'inibitore jnk (modello umano in vitro)

#### OBIETTIVO

Studi precedenti hanno evidenziato che il deficit di UBE3A altera la trasmissione sinaptica, ma le vie coinvolte devono essere definite. Gli obiettivi di questo studio sono l'esplorazione nel modello di topo con SA, così come nei neuroni derivati da iPSC da pazienti con SA selezionati, l'associazione tra segnalazione JNK e deficit di UBE3A e il test dell'efficacia dell'inibizione di JNK con un peptide inibitore di cellule permeabile specifico (D- JNKI1). Sono in corso l'attivazione della via di segnalazione JNK e la sua regressione dal peptide D-JNKI1 in un modello di topi in vivo (B6.129S7-Ube3a<sup>tmAlb</sup>) e in un modello in vitro (neuroni derivati da iPSC di pazienti con SA).

#### PROPOSITI DEL MODELLO UMANO IN VITRO

- Generazione di iPSC dal sangue dei pazienti con SA e da gruppi di controllo, utilizzando pazienti rappresentativi dei diversi difetti genetici di SA. Differenziazione dei neuroni corticali, studio del deficit sinaptico e JNK sul modello mediante marcatori biochimici, morfologici ed elettrofisiologici.
- Somministrazione cronica e acuta dell'inibitore JNK, D-JNKI 1 su i-neuroni derivati da pazienti e gruppi di controllo per studiare un potenziale salvataggio. A

#### RISULTATI

##### Modello umano in vitro

È stato raccolto del sangue da pazienti con delezione (1), UPD (1), mutazioni puntiformi di UBE3A (3) e difetti dell'impronta (2) e da due gruppi di controllo correlati, le iPSC sono state generate da virus Sendai non integrati. È interessante notare che un caso con mosaico ID ha fornito un clone normale e più cloni isogeni ID. Sono stati valutati marcatori di pluripotenza e stabilità genomica e almeno 2 cloni per paziente si sono differenziati nei neuroni corticali. La differenziazione nei casi mosaico e UPD è in corso. È stata eseguita l'analisi morfologica su neuroni di 42 giorni, al fine di





ORGANIZZAZIONE SINDROME DI ANGELMAN

Via Bressa n° 8 31100 TREVISO

Tel. 0422411132 Fax.0422319571

C.F.94047800266

<http://www.sindromediangelman.org>

Email: [orsa@sindromediangelman.org](mailto:orsa@sindromediangelman.org)



identificare i biomarcatori adatti per valutare il salvataggio quando sarà somministrato l'inibitore JNK. Il numero di rami, la lunghezza media del ramo, il numero di giunzioni di pazienti e 4 gruppi di controllo (due precedentemente differenziati) di neuroni su vetrini immunocolorati per MAP2 e TuJ1 hanno rivelato una differenza significativa, variabile in base al difetto molecolare. La lunghezza

del neurone ha mostrato una differenza significativa solo nel paziente con delezione. Stiamo eseguendo immunofluorescenza e western blot sui neuroni a 100 giorni per valutare l'attivazione delle vie JNK, ERK e PSD95. I dati preliminari verranno mostrati.

## CONCLUSIONI

I-neuroni derivanti da ogni classe di mutazione sono stati ottenuti da pazienti con Sindrome di Angelman rappresentativi di tutte le classi molecolari con difetti di UBE3A. I dati preliminari evidenziano, nei pazienti, differenze morfologiche significative rispetto ai gruppi di controllo, ma anche tra i pazienti con gradi differenti di disabilità intellettuale. Questi dati devono essere replicati su una più ampia coorte di pazienti e saranno utili per valutare l'efficacia del peptide inibitore del JNK.

### **Tiziana Borsello, Dottorato di ricerca**

Professoressa di Anatomia Umana, Morte Neuronale e Laboratorio di Neuroprotezione

Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari

CEND - Centro di Eccellenza per le Malattie Neurodegenerative

Milano, Italia

[Potenziale approccio terapeutico al deficit sinaptico nella sindrome di Angelman: il peptide dell'inibitore JNK \(modello in vivo del topo\)](#)

La Sindrome di Angelman (SA) è una malattia neurologica debilitante causata dalla mutazione dell'ubiquitina ligasi E3 Ube3A, un gene associato a disturbi dello spettro autistico (DSA). La funzione di Ube3A durante lo sviluppo del sistema nervoso e il modo in cui le mutazioni di Ube3A provochino deficit locomotori/cognitivi negli individui SA non sono chiare. Utilizzando un modello di topo Ube3A m-/p+ carente in eterozigoti materni, emerge che l'alterazione della funzione di Ube3A causa un aumento a valle dell'attivazione del segnale JNK da stress. Infatti, nei topi Ube3a m-/p+, il rapporto P-JNK/JNK è aumentato e, di conseguenza, anche il suo target elettivo c-Jun (rapporto p-c-Jun/c-Jun) è aumentato. È importante sottolineare che l'attivazione della via dello stress è ben correlata con l'insorgenza di difetti comportamentali di Ube3a m-/p+. Dato che JNK riveste un ruolo



ORGANIZZAZIONE SINDROME DI ANGELMAN

Via Bressa n° 8 31100 TREVISO

Tel. 0422411132 Fax.0422319571

C.F.94047800266

<http://www.sindromediangelman.org>

Email: [orsa@sindromediangelman.org](mailto:orsa@sindromediangelman.org)



importante nella funzione/disfunzione sinaptica, abbiamo analizzato la sua attivazione a livello della colonna vertebrale e abbiamo esaminato i cambiamenti del marcatore biochimico nella regione PSD del compartimento post-sinaptico. Abbiamo osservato che, rispetto ai topi di controllo, i topi Ube3a m-/p+ presentano un'attivazione significativa su JNK e un'alterazione dei livelli dei marcatori biochimici sia nella corteccia che nell'ippocampo. Questi dati evidenziano, in linea con la letteratura, la riduzione del numero di recettori AMPA, patologia della colonna vertebrale del modello Ube3a m-/p+. Dopo la definizione e la scoperta dell'attivazione della via di segnalazione JNK a 7 settimane, abbiamo deciso di somministrare D-JNKI1, il peptide inibitore specifico di JNK, al fine di prevenire l'azione di JNK in vivo e di determinare il suo ruolo nei topi Ube3a m-/p+. I topi hanno ricevuto iniezioni intraperitoneali di D-JNKI1 ogni 4 settimane e lo studio del loro stato di benessere, a livello locomotorio/cognitivo è in corso. I dati preliminari a 7 e 15 settimane hanno mostrato che sia i maschi che le femmine Ube3a m-/p+ presentavano un significativo deficit cognitivo (test NORT) e una significativa diminuzione dell'attività locomotoria (test Rotarod) rispetto ai topi ctr. È importante sottolineare che i topi Ube3a m-/p+ trattati con D-JNKI1 hanno mostrato un miglioramento generale delle condizioni di benessere. Riteniamo che, in questi topi con SA, JNK regoli i disturbi locomotori/cognitivi contribuendo alla disfunzione sinaptica delle sinapsi eccitatorie. Ciò suggerisce che l'inibizione di JNK possa contrastare i sintomi della SA in vivo.

### **Ben Philpot, Dottorato di ricerca**

Philpot Lab, Università del Nord Carolina, USA

### **Opportunità di terapie per la Sindrome di Angelman e biomarcatori clinici**

Studi preclinici rivelano che esistano grandi speranze per la terapie della Sindrome di Angelman. Tuttavia, non c'è ancora stata una sperimentazione clinica di successo per la sindrome. Molti studi clinici falliscono perché non sono stati identificati end-point clinici appropriati. Il Philpot Lab sta ora studiando i fenotipi clinicamente rilevanti e il loro potenziale come biomarcatori per eventuali studi clinici volti a sviluppare nuove terapie per la Sindrome di Angelman. A tal fine, stiamo i tracciati dell'attività elettrica del cervello (attività EEG) che differiscono tra individui con Sindrome di Angelman e individui neurotipici. I tracciati EEG possono essere utilizzati come biomarcatori per il recupero della funzione, possibilità che dimostriamo nei modelli dei topi con Sindrome di Angelman. In questo intervento discuterò dei nostri attuali sforzi per sviluppare terapie per la Sindrome di Angelman e su come possiamo utilizzare i biomarcatori EEG per testare la potenziale efficacia delle terapie nelle prossime sperimentazioni cliniche.

### **Kiyoshi Egawa,**

Dipartimento Pediatrico, Hokkaido

Università di Medicina, Giappone



ORGANIZZAZIONE SINDROME DI ANGELMAN

Via Bressa n° 8 31100 TREVISO

Tel. 0422411132 Fax.0422319571

C.F.94047800266

<http://www.sindromediangelman.org>

Email: [orsa@sindromediangelman.org](mailto:orsa@sindromediangelman.org)



## Disfunzione inibitoria mediata dal GABA e contributo patofisiologico nella sindrome di Angelman

Nella Sindrome di Angelman (SA), la disfunzione GABAergica è stata clinicamente messa a fuoco come meccanismo patofisiologico, poichè la maggior parte dei pazienti con SA implica l'aploinsufficienza del recettore GABA $\alpha$  nei geni delle subunità  $\beta$ 3,  $\alpha$ 5 e  $\gamma$ 3 (SA per delezione - SA Del). Molti ricercatori ritengono che la ridotta espressione di questi geni causi la gravità dei sintomi in SA Del rispetto ai pazienti senza delezione (SA non-Del). In effetti, il nostro studio precedente che valutava le risposte somatosensoriali primarie ha indicato un trattamento sensoriale talamo-corticale aberrante esclusivamente in SA Del, ma non in SA non-Del. D'altro canto, la risposta somatosensoriale nella sindrome di Prader-Willi, che coinvolge pazienti con delezione paterna, era paragonabile a quella dei controlli sani. Questi risultati implicano che, sia la carenza di UBE3A, sia l'aploinsufficienza dei geni delle subunità del recettore GABA $\alpha$ , inducono la disfunzione GABAergica e la loro cooperazione si traduce nella risposta somatosensoriale aberrante in SA Del. Poiché la carenza di UBE3A induce la disfunzione GABAergica, abbiamo scoperto il decremento dell'inibizione tonica causata da eccedenze del trasportatore neuronale GABA 1 (GAT1) nelle cellule di granuli cerebrali dei topi knock-out *Ube3a* (topi con SA). Questa riduzione dell'inibizione tonica può contribuire alla disfunzione motoria di SA, in quanto, la somministrazione acuta di Gaboxadol, agonista selettivo per i recettori GABA $\alpha$  extrasinaptici contenenti la subunità  $\delta$ , ha migliorato la disfunzione motoria nei topi con SA. L'inibizione tonica era analogamente diminuita nei neuroni piramidali dell'ippocampo e della corteccia, ma non nei neuroni talamocorticali situati nel talamo, a causa del diverso pattern di espressione di GAT1. Questa riduzione specifica, piuttosto che globale, dell'inibizione tonica può causare alcune delle disfunzioni neuronali nella SA attraverso l'interruzione di reti talamocorticali intatte. Questa intuizione può spiegare una risposta somatosensoriale aberrante osservata in SA Del perché la subunità  $\alpha$ 5 è prevalentemente espressa nella corteccia o nell'ippocampo e comprende i recettori extrasinaptici. Per chiarire questo concetto, stiamo studiando gli effetti del modulatore allosterico positivo per  $\alpha$ 5 in topi con SA e la differenza di inibizione tonica tra genotipo utilizzando cellule staminali pluripotenti indotte. Comprendere la diversa disregolazione dell'inibizione tonica dalla regione del cervello e dal genotipo può essere la chiave per stabilire una terapia di supporto migliore per SA.

**Christel Kennegießler-Leitner**

Gruppo di ricerca Angelman e.V. Germany

Germania

Estratto di cannabidiolo come nuovo approccio nella terapia anticonvulsivante per la sindrome di Angelman basata sul profilo del neurotrasmettitore, considerando soprattutto il GABA e il glutammato





ORGANIZZAZIONE SINDROME DI ANGELMAN

Via Bressa n° 8 31100 TREVISO

Tel. 0422411132 Fax.0422319571

C.F.94047800266

<http://www.sindromediangelman.org>

Email: [orsa@sindromediangelman.org](mailto:orsa@sindromediangelman.org)



Nella sindrome di Angelman, alcuni sintomi, ad esempio l'epilessia, sono innescati dal disequilibrio dei neurotrasmettitori. In particolare, è possibile osservare un cambiamento nel bilancio del glutammato GABA verso il deficit di GABA e verso l'eccesso di glutammato. Quando il valore inibitorio del neurotrasmettitore GABA diminuisce ed, eventualmente, il neurotrasmettitore eccitatore di glutammato aumenta allo stesso tempo, può scatenarsi una crisi epilettica. Per questo motivo, alcuni anticonvulsivanti mirano ad aumentare il GABA e ridurre il glutammato. Indubbiamente, questo sembra avere dei benefici. D'altro canto, è proprio la maggior parte di questi farmaci che scatena una serie di effetti collaterali. Anche se il profilo degli effetti collaterali dei nuovi anticonvulsivanti è più benefico rispetto a quello dei precedenti, gli effetti collaterali non devono essere trascurati. In questo contesto, la ricerca per le opzioni future sta andando avanti. Angelman e.V. Germany ha raccolto dati e creato serie di casi clinici. Nell'ambito di questo discorso verranno brevemente presentate queste serie di casi:

- Estratto completo di cannabidiolo in un giovane adulto di sesso maschile con Sindrome di Angelman, delezione classe I e tendenza a crisi epilettiche e stato non convulsivo (NCSE)
- Magnesio come misura aggiuntiva in caso di necessità e imminente attacco epilettico, descritto in relazione a diverse genetiche e diversi tipi di crisi.

Si spera che questi esempi, scelti dalla serie di casi dell'Angelman e.V, stimolino un approfondimento su come utilizzare consapevolmente, nella pratica, GABA, CBD e magnesio per regolare il disequilibrio dei neurotrasmettitori. Ulteriori studi in questo settore sono assolutamente desiderabili. Ulteriori studi per rispondere a domande specifiche in questo settore sono altamente desiderabili.

**Bernhard Horsthemke**, Dottorato di ricerca

Jasmin Beygo e Karin Buiting

Universitätsklinikum Essen, Germania

### **Difetti dell'imprinting e diagnosi differenziale**

I difetti di imprinting sono una rara causa genetica della sindrome di Angelman. Si trovano in circa il 3-5% dei pazienti. In casi molto rari, il difetto dell'imprinting è dovuto alla delezione del centro di imprinting SA (SA-CI) ed è associato a un aumento del rischio di recidiva, se la madre porta la delezione. In 183 pazienti con un difetto di imprinting ma senza una delezione SA-CI, non abbiamo rilevato alcuna mutazione nel SA-CI. Successivamente abbiamo verificato se varianti di sequenza comuni modificano il rischio di un difetto dell'imprinting. L'SA-CI contiene diversi polimorfismi del DNA comuni (cinque SNP e un polimorfismo di inserzione/delezione TATG), che costituiscono cinque aplotipi. Con un test di disequilibrio di trasmissione in 119 trii genitore-figlio abbiamo trovato una sovra-trasmissione materna di aplotipo H-AS3 ( $p = 0,0073$ ), che è l'unico aplotipo che include



ORGANIZZAZIONE SINDROME DI ANGELMAN

Via Bressa n° 8 31100 TREVISO

Tel. 0422411132 Fax.0422319571

C.F.94047800266

<http://www.sindromediangelman.org>

Email: [orsa@sindromediangelman.org](mailto:orsa@sindromediangelman.org)



l'allele di delezione TATG. I difetti dell'imprinting si presentano spesso in forma di mosaico (-40% dei pazienti con un difetto dell'imprinting). Questi pazienti mostrano un funzionamento più elevato e hanno meno probabilità di esibire un classico comportamento del fenotipo fisico: alcuni assomigliano alla sindrome di Prader-Willi. Le diagnosi differenziali per la sindrome di Angelman comprendono la sindrome di Phelan-McDermid (delezione 22q13,3), la sindrome di aploinsufficienza di MBD5 (delezione 2q23,1), la sindrome di aploinsufficienza di KANSL1 (delezione 17q21,31), la sindrome di Rett (mutazioni in MECP2), la sindrome di Pitt-Hopkins (TCF4), la sindrome di Christianson legata all'X (SLC9A6), la sindrome di Mowat-Wilson (ZEB2) e altre. Se, in un paziente, i difetti del cromosoma 15 sono esclusi, bisognerebbe prendere in considerazione una qualsiasi delle sindromi e dei test specifici genetici sopra citati. In alternativa, bisognerebbe eseguire un'analisi del pannello genico o un sequenziamento dell'intero esoma.

**Ed Weeber**, Dottorato di ricerca

Farmacologia e Fisiologia Molecolare

CSO Byrd Alzheimer's Institute, USA

e anche per AGILIS Biotherapeutics, USA

#### [Strategie di sostituzione del gene o della proteina UBE3A mediate dai virus adeno-associati](#)

Nel 2011 il nostro gruppo ha pubblicato una relazione dal titolo "Virus adeno-associato (AAV) - Salvataggio mediato dei difetti cognitivi in un modello di topi per la sindrome di Angelman". Concentrandosi solo sull'ippocampo, abbiamo mostrato un recupero dei difetti di memoria spaziale e associativa, nonché un'alterazione alla base della plasticità sinaptica dell'ippocampo. Questa ricerca ha rivelato che, a dimostrazione di tale concetto, l'utilizzo di un adeno-virus come sistema di consegna per la sostituzione del gene UBE3A potrebbe essere efficacemente sviluppato in una strategia praticabile come terapia contro la Sindrome di Angelman negli umani. Grazie alla collaborazione con PTC Therapeutics, stiamo sviluppando strategie per la sostituzione del gene UBE3A o per la sostituzione della proteina UBE3A nel SNC umano. Utilizzando il gene UBE3A umano, ci stiamo attualmente concentrando sull'ottenimento di dati preclinici al fine di determinare il dosaggio ottimale, l'obiettivo regionale del SNC, il sierotipo AAV e il miglior costrutto di supporto. Grazie all'utilizzo del modello di topo SA e del modello di ratto SA recentemente sviluppati, e grazie all'esperienza di PTC Therapeutics negli studi clinici degli AAV umani, stiamo rendendo realtà la sostituzione del gene UBE3A mediata da AAV nella popolazione di pazienti affetti da SA.

**Rebecca Crean**

Direttrice, Sviluppo Clinico,

IONIS Pharmaceuticals, USA



ORGANIZZAZIONE SINDROME DI ANGELMAN

Via Bressa n° 8 31100 TREVISO

Tel. 0422411132 Fax.0422319571

C.F.94047800266

<http://www.sindromediangelman.org>

Email: [orsa@sindromediangelman.org](mailto:orsa@sindromediangelman.org)



Tentativi di ricerca sulla storia naturale della Sindrome di Angelman e spiegazione scientifica della terapia a base di oligonucleotidi antisenso

Al fine di elaborare programmi di terapie efficaci per la Sindrome di Angelman, è necessaria una chiara comprensione dell'epidemiologia e delle manifestazioni cliniche della malattia, della sua evoluzione e dei risultati correlati alla malattia. Pertanto, la conoscenza della storia naturale della Sindrome di Angelman è una base essenziale per lo sviluppo efficace del farmaco. Sono necessari studi di storia naturale che valutino le variabili demografiche, definiscano la progressione, identifichino e convalidino i biomarcatori e le misure di valutazione clinica e identifichino il momento ottimale per l'intervento terapeutico, per guidare la progettazione di studi clinici e la selezione degli end-point e per chiarire le differenze di diagnosi, standard di cura e supporto al paziente. Gli studi di storia naturale nella sindrome di Angelman sono stati avviati più di 10 anni fa e continuano tuttora Stati Uniti. Mentre sono richieste sempre più informazioni sul meccanismo della malattia e sulla sua progressione, questa necessità sarà probabilmente soddisfatta dagli studi di storia naturale in corso e futuri. Le informazioni fornite dai dati raccolti hanno quindi informato le nostre iniziative di ricerca per identificare gli oligonucleotidi antisenso (ASO) per una potenziale terapia contro la sindrome di Angelman. Gli ASO sono piccoli composti simili al DNA modificati chimicamente e utilizzabili sottoforma di farmaci, che mirano a specifiche sequenze di RNA e, quindi, modificano la produzione di proteine coinvolte nei processi patologici. La Sindrome di Angelman (SA) è una malattia neurogenetica causata dal deficit materno del gene impresso UBE3A, che codifica una ubiquitina ligasi E3. Tutti i pazienti portano almeno una copia di UBE3A paterno, intatto, ma silenziato nei neuroni da un lungo RNA non codificante, il trascritto antisenso UBE3A (UBE3A-ATS). Un ASO che ha come obiettivo la riduzione della trascrizione di UBE3A-ATS è un metodo specifico e clinicamente fattibile, per il prolungato desilenziamento dell'allele paterno di UBE3A, e che ha come obiettivo l'attivazione della sua espressione nei neuroni. Abbiamo dimostrato nei modelli animali che abbattendo l'UBE3A-ATS con un ASO è possibile stimolare il desilenziamento della UBE3A paterna e invertire alcuni fenotipi comportamentali nei modelli preclinici della Sindrome di Angelman. Questo nuovo approccio fornisce un sistema di riferimento per l'utilizzo di ASO come strategia terapeutica praticabile per il trattamento della Sindrome di Angelman.

**Amit Rakhit, Direttore Generale**

Direttore Sanitario e Portfolio Manager

OVID Therapeutics, USA

OVID Therapeutics. Aggiornamento su SA STAR: risultati topline di una prova clinica di fase 2 sull'adulto e sull'adolescente con Sindrome di Angelman: studio randomizzato e in doppio cieco, della sicurezza e dell'efficacia del Gaboxadol (OV101)



## ORGANIZZAZIONE SINDROME DI ANGELMAN

Via Bressa n° 8 31100 TREVISO

Tel. 0422411132 Fax.0422319571

C.F.94047800266

<http://www.sindromediangelman.org>

Email: [orsa@sindromediangelman.org](mailto:orsa@sindromediangelman.org)



OV101 (gaboxadol) è il primo agonista del recettore extrasinaptico gamma-amminobutirrico (GABA) altamente selettivo che si lega alle subunità  $\alpha 4$  e  $\delta$  e che può ripristinare il deficit nell'inibizione tonica gabaergica associata alla Sindrome di Angelman (SA). L'obiettivo principale della fase 2 di STARS era valutare la sicurezza e l'efficacia di OV101 in adulti/adolescenti con SA dopo 12 settimane di terapia.

### SCOPO

Lo studio STARS di fase 2 è il primo esperimento clinico per SA, randomizzato, in doppio cieco, e controllato con placebo. Ottantotto pazienti (66 adulti e 22 adolescenti) di età compresa tra 13 e 49 anni, e con diagnosi di SA, sono stati randomizzati su tre gruppi: 15 mg OV101 una volta al giorno (QD), 10 mg mattina/15 mg notte OV101 due volte al giorno (BID) e placebo.

### RISULTATI

OV101 ha raggiunto l'end-point primario di sicurezza e tollerabilità misurato dall'incidenza di eventi avversi (AE). OV101 è stato ben tollerato con un'incidenza simile di AE su tutti i bracci di trattamento, la maggior parte degli AE è lieve. Due soggetti hanno avuto un evento avverso grave (SAE), per la precisione, uno per ogni gruppo di trattamento OV101: un soggetto ritenuto "Possibilmente correlato" e l'altro "Non correlato". Dopo 12 settimane di terapia, sono stati valutati gli end-point di efficacia esplorativa che valutano il funzionamento globale, il comportamento, il sonno e la funzione motoria. La CGI-I (Clinician Global Impression-Improvement) è risultata statisticamente significativa nel gruppo di trattamento combinato OV101 rispetto al gruppo placebo ( $p = 0,0206$ ). Ulteriori analisi CGI-I hanno mostrato che OV101 QD a 12 settimane era statisticamente significativo rispetto al placebo ( $p = 0,0006$ ), mentre il gruppo BID non lo era ( $p = 0,3446$ ). Altri punti finali esplorativi su comportamento, sonno e funzione motoria sono in corso e verranno presentati. STARS è il primo studio controllato con placebo nella sindrome di Angelman che ha dimostrato un beneficio clinico sulle manifestazioni globali complessive della sindrome. Lo studio STARS ha raggiunto il suo end-point primario di sicurezza e tollerabilità, mostrando un profilo di sicurezza favorevole di OV101 rispetto a placebo, con la maggior parte degli AE moderati. In termini di efficacia, OV101 ha mostrato un miglioramento statisticamente significativo rispetto al placebo a 12 settimane di trattamento nel CGI-I, ovvero una misura che cattura la natura globale dei sintomi clinici associati a SA. Sono in corso analisi dei domini di comportamento, sonno e funzione motoria.

### **Meghan Miller**

Discovery Project Leader

Michelle Krishnan

Leader in Medicina Traslazionale

Malattie Rare ROCHE Pharma

Ricerca e Sviluppo Precoce ROCHE

Centro per l'Innovazione



ORGANIZZAZIONE SINDROME DI ANGELMAN

Via Bressa n° 8 31100 TREVISO

Tel. 0422411132 Fax.0422319571

C.F.94047800266

<http://www.sindromediangelman.org>

Email: [orsa@sindromediangelman.org](mailto:orsa@sindromediangelman.org)



Basilea, Svizzera

### Traslare terapie ai pazienti con Sindrome di Angelman

La Sindrome di Angelman (SA) è un raro disturbo dello sviluppo neurologico che porta a un ritardo dello sviluppo globale e che include gravi disabilità cognitive, motorie e comunicative, nonché sintomi neurologici, tra cui convulsioni. L'impatto della ridotta indipendenza, della comunicazione non verbale e della vita quotidiana può essere difficile da gestire. Esistono informazioni limitate riguardo alla sfera del caregiver nella SA. Per iniziare ad affrontare questo tema, abbiamo condotto uno studio per sviluppare un modello di concetto di malattia. L'obiettivo di questo studio era quello di ottenere una comprensione completa dell'esperienza paziente/caregiver di SA e del suo impatto sulla vita quotidiana, basandosi su interviste qualitative approfondite di individui con SA. Questo studio è stato condotto con la metodologia delineata nella guida della FDA statunitense ed è in linea con l'attuale iniziativa di sviluppo di farmaci della FDA, che ritiene che l'esperienza sia centrale per lo sviluppo e la valutazione dei farmaci. Tutti i risultati attuali e le implicazioni che ne derivano includono il modello di concetto di malattia. Forniremo un aggiornamento sulle attività pre-cliniche per lo sviluppo di una terapia per SA.

**Tonazzini Ilaria**<sup>1,2</sup>, Masciullo C<sup>2</sup>, Van Woerden GM<sup>1</sup>, Mientjes E<sup>1</sup>, Cecchini M<sup>2</sup>, Elrgersma Y<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Neuroscienze, Erasmus MC, Rotterdam, Paesi Bassi

<sup>2</sup> Istituto Nanoscienze – CNR, Pisa, Italia

### Ruolo dell'ubiquitina ligasi E3a nella guida di contatto assonale: strategie di recupero nei neuroni ippocampali mancanti di UBE3A

Sebbene la lettura dell'ambiente extracellulare neuronale si stia rivelando cruciale per lo sviluppo del cervello, poco si sa su questi processi in condizioni patologiche. L'ubiquitina ligasi E3A (UBE3A) ha funzioni fondamentali nel cervello, essendo il suo squilibrio l'origine genetica più diffusa per gli autismi. Cambiamenti nei suoi livelli di espressione portano infatti a disturbi del neurosviluppo [alla sindrome di Angelman (SA) o all'autismo]. Abbiamo studiato in precedenza la guida neuronale nei neuroni con carenza di UBE3A, modello di SA, utilizzando substrati micro-strutturati che possono indurre specifici stimoli direzionali alle cellule. Abbiamo trovato una polarizzazione carente e una guida di contatto topografica deficitaria nei neuroni carenti di UBE3A, collegati ad un'attivazione disregolata dell'adesioni focali (FA). Qui, studiamo in modo selettivo la guida di contatto dell'assone e dei dendriti e le caratteristiche morfologiche neuronali dei neuroni Wild-Type, UBE3A-deficient (SA) e UBE3A-overexpressing su substrati microstrutturati, con l'obiettivo di chiarire ulteriormente il ruolo dell'UBE3A nella guida neuronale. Inoltre, testiamo l'effetto dei trattamenti farmacologici che agiscono sulla contrattilità del citoscheletro per ripristinare una corretta guida topografica nei neuroni carenti di UBE3A. Infine, analizziamo i processi molecolari che regolano FA. Dimostriamo





ORGANIZZAZIONE SINDROME DI ANGELMAN

Via Bressa n° 8 31100 TREVISO

Tel. 0422411132 Fax.0422319571

C.F.94047800266

<http://www.sindromediangelman.org>

Email: [orsa@sindromediangelman.org](mailto:orsa@sindromediangelman.org)



che la perdita di guida assonale è specifica per i neuroni SA, mentre l'eccessiva presenza (overexpression) di UBE3A non compromette né la polarizzazione direzionale neuronale, né la guida.. Infine, una bassa dose di nocodazolo, un farmaco che aumenta la contrattilità cellulare, ha dimostrato di migliorare l'allineamento dei neuriti ripristinando l'attivazione del percorso di FA. Questo lavoro è supportato da MSCA-IF-2017 grant Neuroguide (795948).