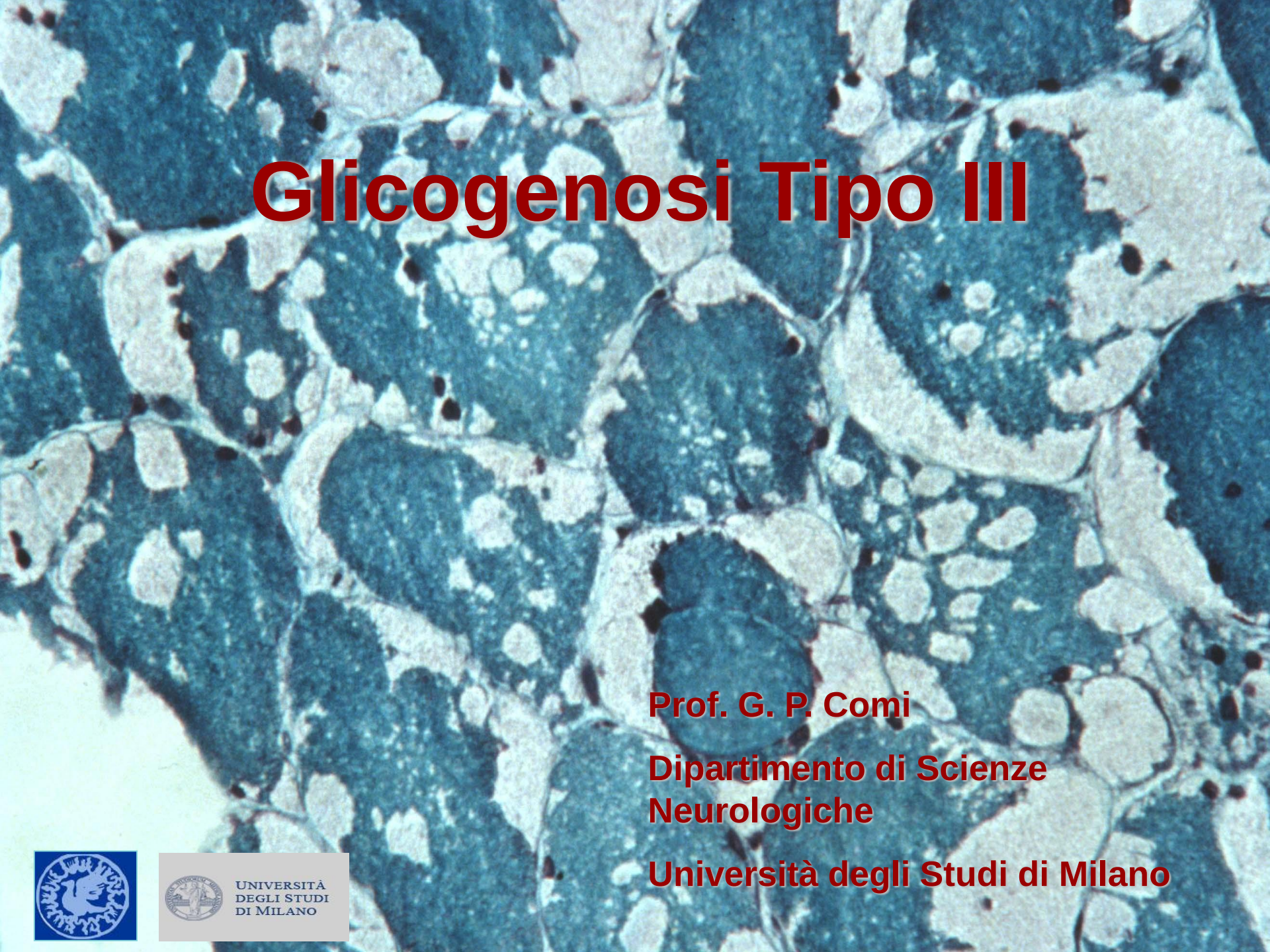
Glicogenosi Tipo III



Prof. G. P. Comi

Dipartimento di Scienze Neurologiche

Università degli Studi di Milano

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

GLICOGENOSI TIPO III

- **Linee guida per la diagnosi e la gestione clinica**
- **Aggiornamento sul Progetto modello murino**
- **Approcci terapeutici**

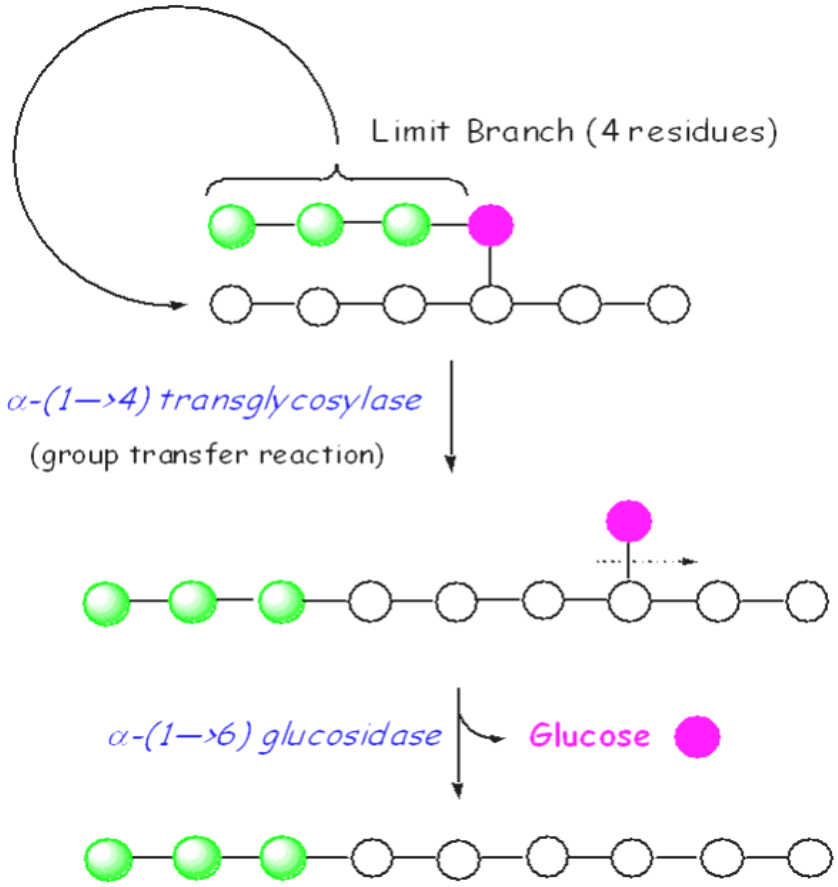
Glycogen Storage Disease Type III diagnosis and management guidelines

Priya S. Kishnani, MD[1], Stephanie L. Austin, MS, MA[1], Pamela Arn, MD[4], Deeksha S. Bali, PhD[1], Anne Boney, MED, RD, LDN[1], Laura E. Case, PT, DPT, MS, PCS[2], Wendy K. Chung, MD, PhD[5], Dev M. Desai, MD[6], Areeg El-Gharbawy, MD[1], Ronald Haller, MD[7], G. Peter A. Smit, MD, PhD[8], Alastair D. Smith, MB, ChB[9], Lisa D. Hobson-Webb, MD[3], Stephanie Burns Wechsler, MD[1], David A. Weinstein, MD, MMSc[3], and Michael S. Watson, PhD[10]

From the Departments of [1]Pediatrics, [2]Community and Family Medicine, and [3]Medicine, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina; [4]Department of Pediatrics, Nemours Children's Clinic, Jacksonville, Florida; [5]Department of Pediatrics, Columbia University Medical Center, New York, New York; [6]Departments of Surgery and Pediatrics, [7]Departments of Neurology and Internal Medicine, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas; [8]Department of Pediatrics, University Medical Center Groningen, Groningen, The Netherlands; [9]Department of Pediatrics, University of Florida College of Medicine, Gainesville, Florida; [10]American College of Medical Genetics, Bethesda, Maryland.

Priya S. Kishnani, MD, Duke University Medical Center, Box 103856 DUMC, Durham, North Carolina. E-mail: kishn001@mc.duke.edu.

Amilo-1,6-glucosidasi, 4-αglucantransferasi

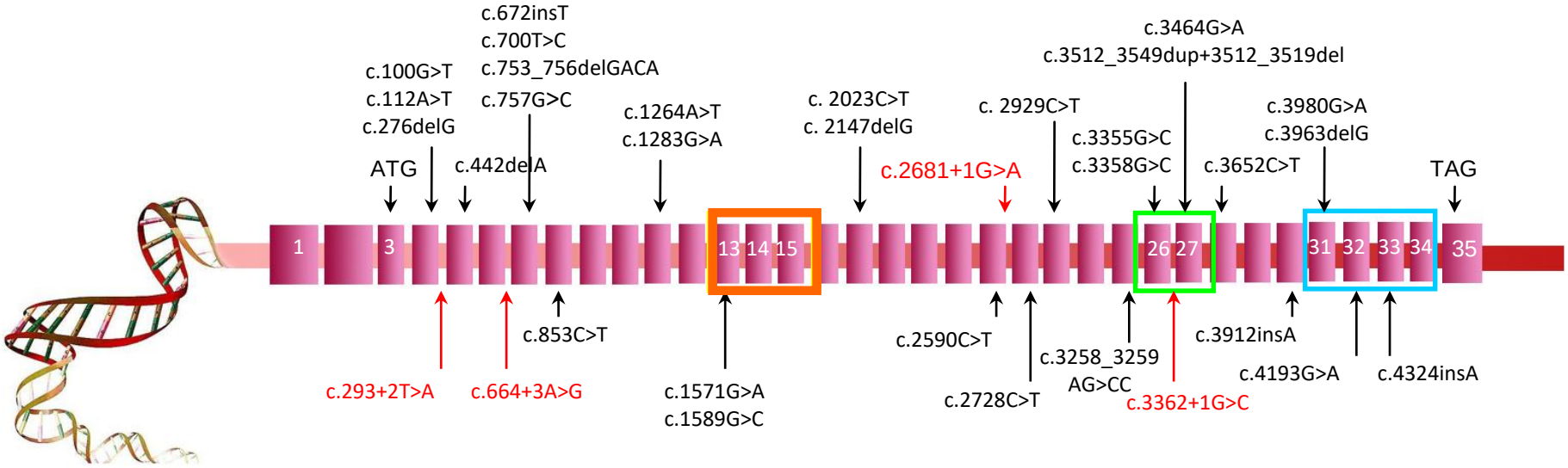


1. **Reazione inversa: velocità di incorporazione del ^{14}C-Glucosio nel glicogeno**
2. **Liberazione di glucosio dalla destrina limite ottenuta con la reazione alla Fosforilasi**

Hers, Verhue, VanHoof, Eur J Biochem 2:257, 1967

ANALISI GENETICA

Dominio Trasferasico | **Dominio Glucosidasico** | **Legame Glicogeno**



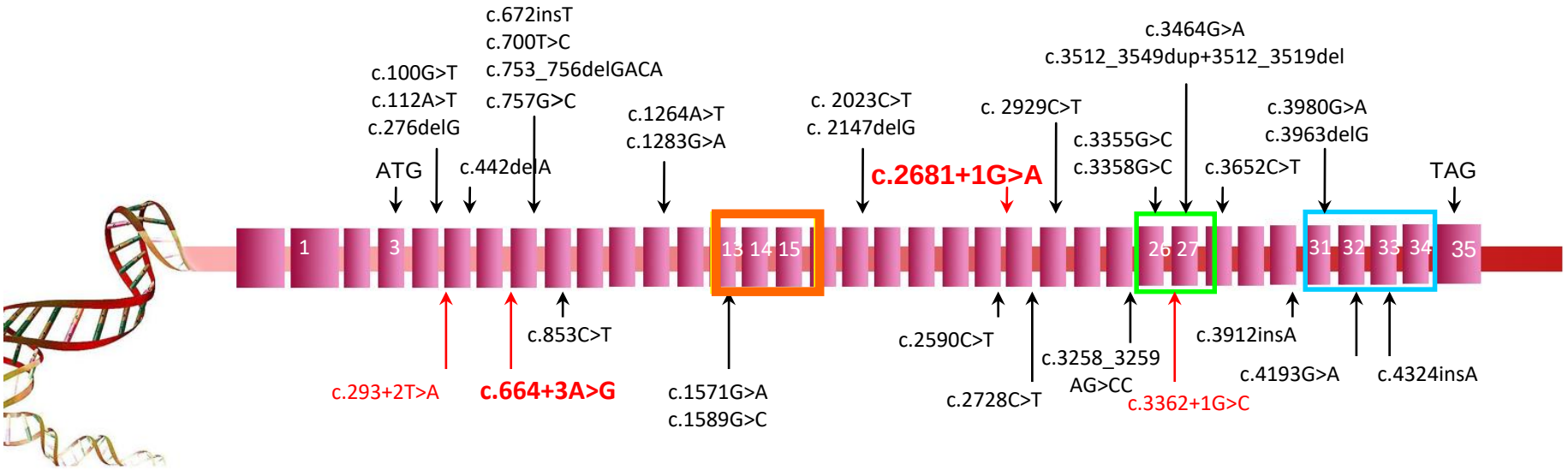
Screening di 57 pazienti:

- 38 pazienti (66,7%): 2 mutazioni
- 7 pazienti (12,3%): 1 mutazione
- 12 patienti (21%): 0 mutazioni

-> ✓ Le mutazioni sono distribute lungo tutto il gene.

✓ Mutazioni private

for biochemical analysis. Usually 30–40 mg of tissue or four cores of liver tissue are required for all the studies necessary to make a definitive diagnosis. In the United States, reliable enzymatic analysis is only available on frozen muscle and liver biopsy samples.



Analisi genetica:

- 39,8% splicing
- 24,1% nonsense
- 16,9% missense
- 9,6% microinserzioni
- 8,4% microdelezioni
- 1,2% micro-rearrangementi

24,1%: c.2681+1G>A (IVS21 +1 G>A)

10,8%: c.664+3A>G (IVS6 +3 A>G)

NUTRIZIONE

Consultare un dietista esperto di malattie metaboliche

Neonati e bambini:

- Fare piccoli e frequenti pasti (includendo proteine e carboidrati complessi ed evitando zuccheri semplici) ed evitare il digiuno
- In caso di ipoglicemia, introdurre la maizena già fin dal primo anno di vita del bambino
- Per evitare il digiuno notturno possono essere necessari uno spuntino prima di coricarsi, la somministrazione di maizena e/o nutrizione enterale continua

Adolescenti ed adulti:

- La dieta deve essere **ricca di proteine** (25% del fabbisogno calorico giornaliero) e povera di carboidrati complessi (<50% del fabbisogno calorico). Evitare zuccheri semplici e periodi di digiuno è molto importante soprattutto per i pazienti con GSD IIIa.
- I pazienti con miopatia possono beneficiare dall'assunzione, prima di coricarsi, di latte scremato arricchito in proteine o dalla somministrazione di una formulazione ricca di proteine con nutrizione enterale notturna
- I pazienti con GSD IIIb possono passare ad una regolare dieta bilanciata

Linee guida ACMG: Kishnani et al. Genetics in Medicine 2010

FOLLOW-UP EPATICO

- Analisi ematiche per la valutazione di **AST, ALT, PT, albumina** e **bilirubina** sieriche ogni 6 mesi/1 anno consentono di monitorare il danno epatico e l'eventuale progressione della cirrosi
- I livelli ematici di alfa-feto proteina e CEA non consentono di prevedere la presenza di adenomi epatocellulari o di trasformazione maligna
- L'**ecografia addominale** dovrebbe essere eseguita nei bambini ogni 12-24 mesi.
- TAC addominale o risonanza magnetica con contrasto dovrebbero essere eseguite ogni 6-12 mesi nei pazienti adulti in cui i sintomi clinici e i risultati dei test laboratoristici le rendono necessarie.di MELD
- Montorare il valore di MELD per valutare la gravità di interessamento epatico.

Linee guida ACMG: Kishnani et al. Genetics in Medicine 2010

FOLLOW-UP CARDIACO

ECOCARDIOGRAFIA: permette di controllare l'ipertrofia ventricolare, lo spessore del setto atrio-ventricolare, la massa ventricolare, la funzione sistolica e quella diastolica

- **GSD IIIa**: ripetere ogni 12-24 mesi
- **GSD IIIb**: ripetere ogni 5 anni

ECG a 12 derivazioni: controllo dell'aritmia

- **GSD IIIa**: ripetere ogni 2 anni

In pazienti con ipertrofia ventricolare significativa e/o sintomi clinici ripetere ecocardiogramma ed ECG più di frequente

Linee guida ACMG: Kishnani et al. Genetics in Medicine 2010

FOLLOW-UP MUSCOLARE 1

1) La valutazione neuromuscolare nei pazienti è raccomandata ogni 6 mesi o più frequentemente, se necessario. La valutazione deve comprendere:

2) Valutazione muscoloscheletrica:
   - Mobilità/ipermobilità/estensione muscolare
   - Postura e allineamento della colonna vertebrale
   - Allineamento pelvico
   - Stabilità della base di appoggio nel mantenimento della stazione eretta
   - Ginocchio valgo/ricurvato
   - Allineamento di piede e caviglia
   - Iperestensione del gomito

- Valutazione di forza e resistenza
- Valutazione del dolore
- Valutazione del raggiungimento delle appropriate tappe di sviluppo

3) Valutazione della capacità di eseguire gli esercizi

FOLLOW-UP MUSCOLARE 2

4) Coordinamento con gli altri specialisti (es. nutrizionista, cardiologo) per ottimizzare il tipo di esercizio fisico

5) Intervento fisioterapico

6) Inoltre si possono rendere necessari

- Tutori per le mani
- Aiuti per la deambulazione
- Modificazioni per la guida dell'auto

7) Valutazione neuromuscolare alla diagnosi e durante il follow-up che include:

- Trattamento della debolezza delle mani (es. sindrome del tunnel carpale)
- Caratterizzazione di neuropatie periferiche e di fattori non correlati alla GSD III (es. diabete mellito, neuropatia demielinizzante…)

8) EMG/ studi di conduzione nervosa se compaiono segni di polineuropatia o debolezza dei muscoli intrinseci della mano

9) Consulto ortopedico se necessario

Linee guida ACMG: Kishnani et al. Genetics in Medicine 2010

MEDICINA GENERALE

1) **Vaccinazioni** di routine, inclusa epatite B

2) Braccialetti e lettere di emergenza in caso di ipoglicemia

3) Cautela con i **farmaci** che possono causare ipoglicemia:

- I beta-bloccanti devono essere usati con cauteli nei pazienti con cardiopatia in quanto posso mascherare i sintomi dell'ipoglicemia

4) Attenzione ai farmaci ipolipidemizzanti come le statine che possono smascherare o peggiorare la miopatia

5) Attenzione al **digiuno prolungato**:

- Durante anestesie e interventi chirurgici
- Durante i periodi in cui la malattia è asintomatica

Linee guida ACMG: Kishnani et al. Genetics in Medicine 2010

GINECOLOGIA E OSTETRICIA

1) Evitare l'uso di estrogeni come **contraccettivi orali**
2) Durante tutta la gravidanza, il travaglio e il parto è molto importante mantenere stabile la **glicemia** ed evitare ipoglicemia e chetosi
3) Pianificare un parto indotto è importante per assicurare il benessere di madre e figlio

Linee guida ACMG: Kishnani et al. Genetics in Medicine 2010

CHIRURGIA E ANESTESIA

1) La valutazione preoperatoria deve includere l'analisi degli enzimi epatici e della funzionalità epatica in modo da determinare la scelta dell'anestetico più appropriato
2) Mantenere stabile il **glucosio >70 mg/dL** anche mediante l'infusione endovenosa di glucosio
3) Evitare l'uso di farmaci come la succinilcolina che può causare rabdomiolisi
4) Monitorare costantemente la glicemia nel periodo pre-, peri- e post-operatorio

Linee guida ACMG: Kishnani et al. Genetics in Medicine 2010

COUNSELING GENETICO E DIAGNOSI PRENATALE

1) Offrire il **counseling genetico** a tutti i genitori di figli con GSD III e a tutti gli adulti affetti
2) Determinare le mutazioni nel gene ***AGL*** quando possibile

Diagnosi prenatale:

Il test genetico è l'analisi preferenziale quando entrambe le mutazioni sono conosciute

Linee guida ACMG: Kishnani et al. Genetics in Medicine 2010

Prospettive

- E’ necessario definire alcuni aspetti critici nella GSD III prima di testare clinicamente strategie terapeutiche

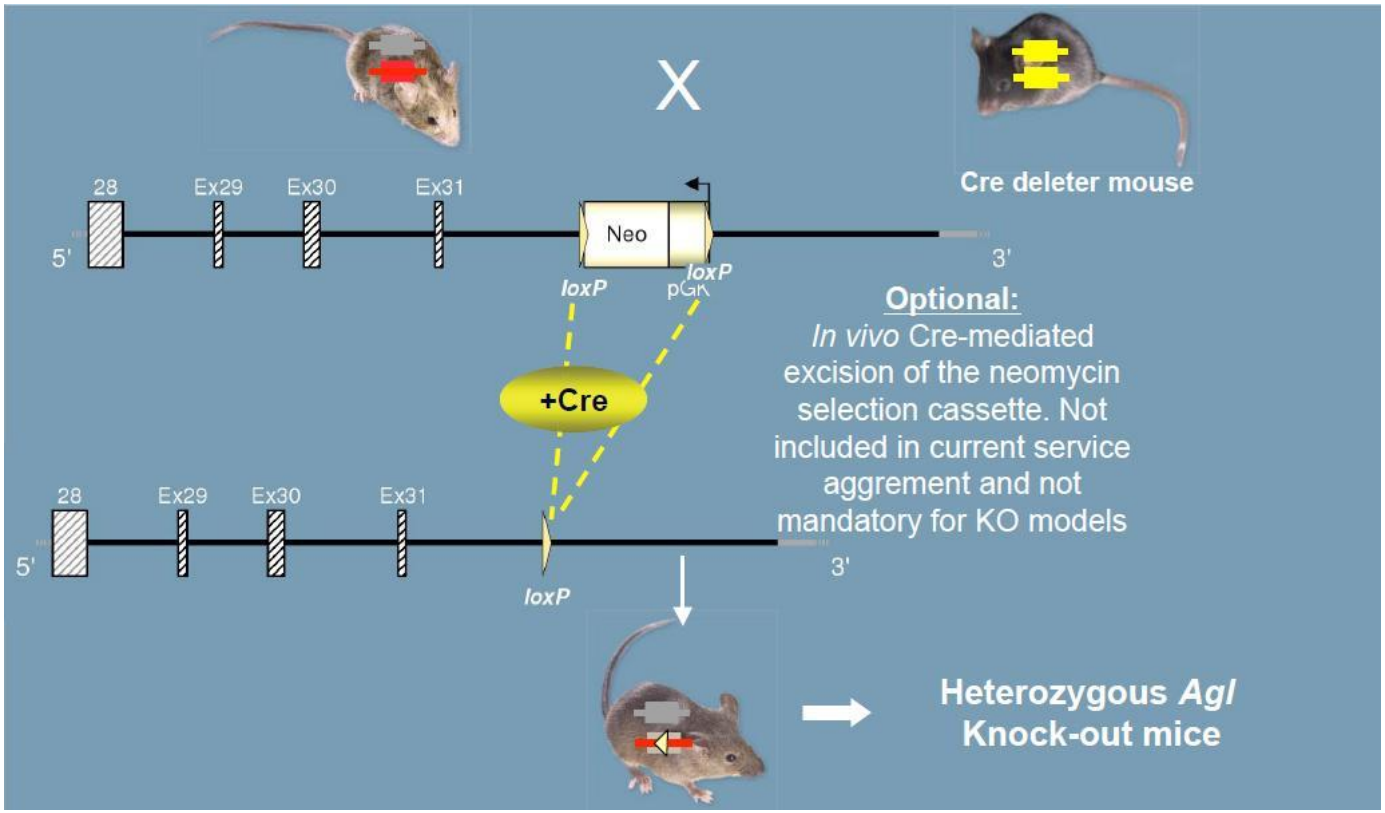
- E’ insoddisfacente la nostra attuale ricognizione della storia naturale della malattia, in particolare per quanto attiene a parametri quantitativi di stima della progressione.

- Occorre definire dei biomarcatori sensibili che correlino con i dati clinico-patologici e/o con i differenti gradi di interessamento clinico della malattia. E’ stato proposto il dosaggio di un metabolita urinario (Hex4) che correlerebe con la gravità, ma aspetta validazione in ampi studi.

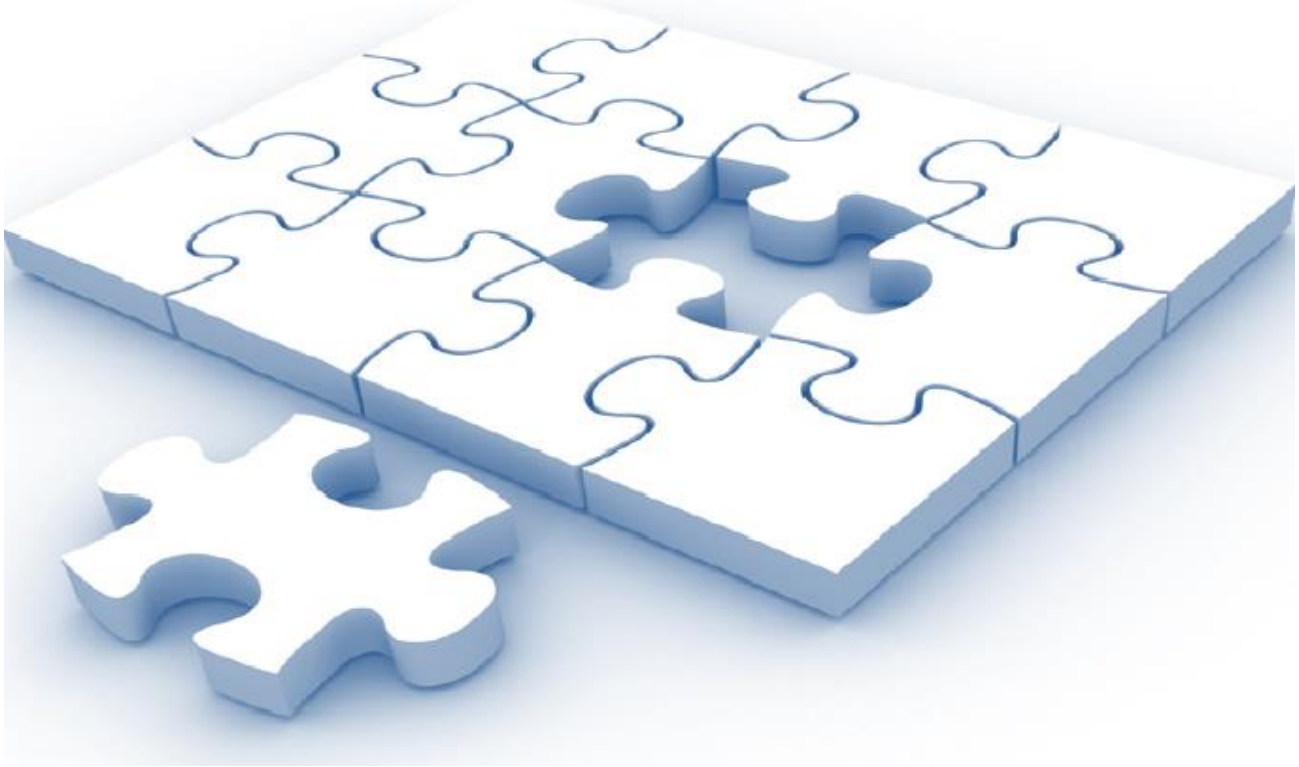
- Vanno meglio caratterizzate le complicanze a lungo termine dei tessuti epatico, cardiaco, nervo e muscolo striato.

- Sono necessari modelli animali per aumentare la nostra comprensione della malattia e definire future terapia.-

Constitutive knock-out model by deletion of the glycogen-binding domain



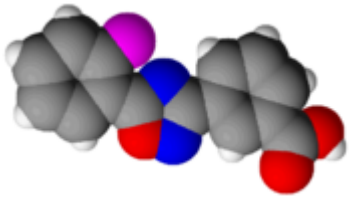
LA terapia per le malattie genetiche rare: un'opportunità per la medicina personalizzata



Mutazioni nonsenso

Patient	Age (ys)	Nucleotide change	Protein effect	Exon	Codon		Loss of Deambulation (age)	Walton at last evaluation
I	27	c.10219G>T	E3407X	70	TAA	Novel	12 ys	9
II	18	c.8038C>T	R2680X	55	TGA	Leiden	9 ys	9
III	12	c.10108 C>T	R3370X	70	TGA	Leiden	10 ys	8
IV.1	12	c.6943G>T	E2315X	48	TAA	Leiden	8 ys	8
V	20	c.2227C>T	Q743X	18	TAG	Leiden	11 ys	9
VI	8	c.6943G>T	E2315X	48	TAA	Leiden	No	6
VII	15	c.8608C>T	R2870X	58	TGA	Leiden	11ys	8
VIII	8	c.10651C>T	Q3551X	75	TAG	Novel	No	7
IX	9	c.8608C>T	R2870X	58	TGA	Leiden	No	5
X	6	c.10108C>T	R3370X	70	TGA	Leiden	No	2
XI	7	c.8944C>T	R2982X	60	TGA	Leiden	No	4
XII	6	c.9100C>T	R3034X	61	TGA	Leiden	No	3
XIII	4	c.4117C>T	G1373X	30	TAG	Novel	No	2
XIV	4	c.3580C>T	Q1194X	26	TAG	Leiden	No	2
XV	4	c.4996C>T	R1666X	35	TGA	Leiden	No	2
XVI	2	c.10141C>T	R3381X	70	TGA	Leiden	No	1
XVII	1	c.3940C>T	R1314X	29	TGA	Leiden	No	1

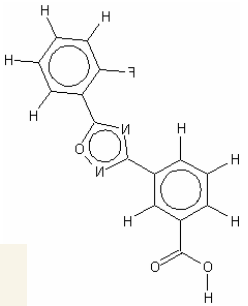
Read through di codoni di stop prematuri - PTC124 (Ataluren)

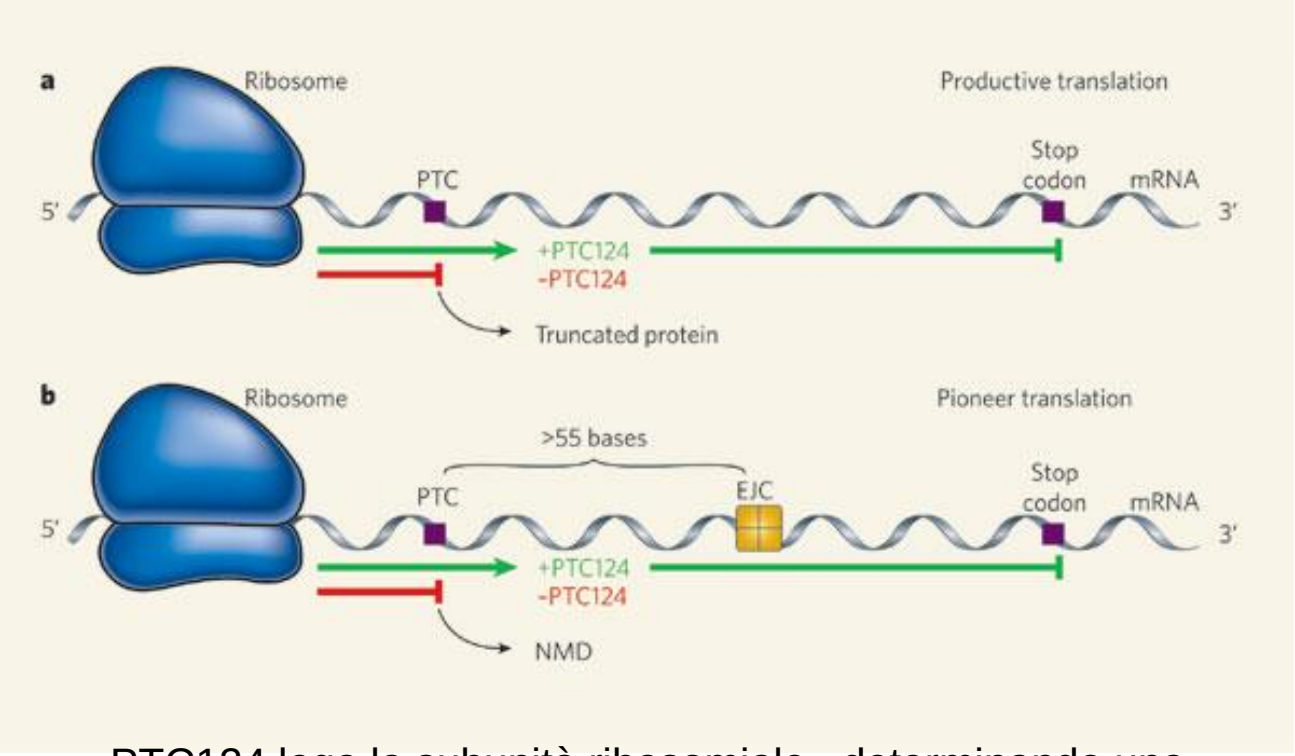


CHEMICAL BIOLOGY

Ignore the nonsense

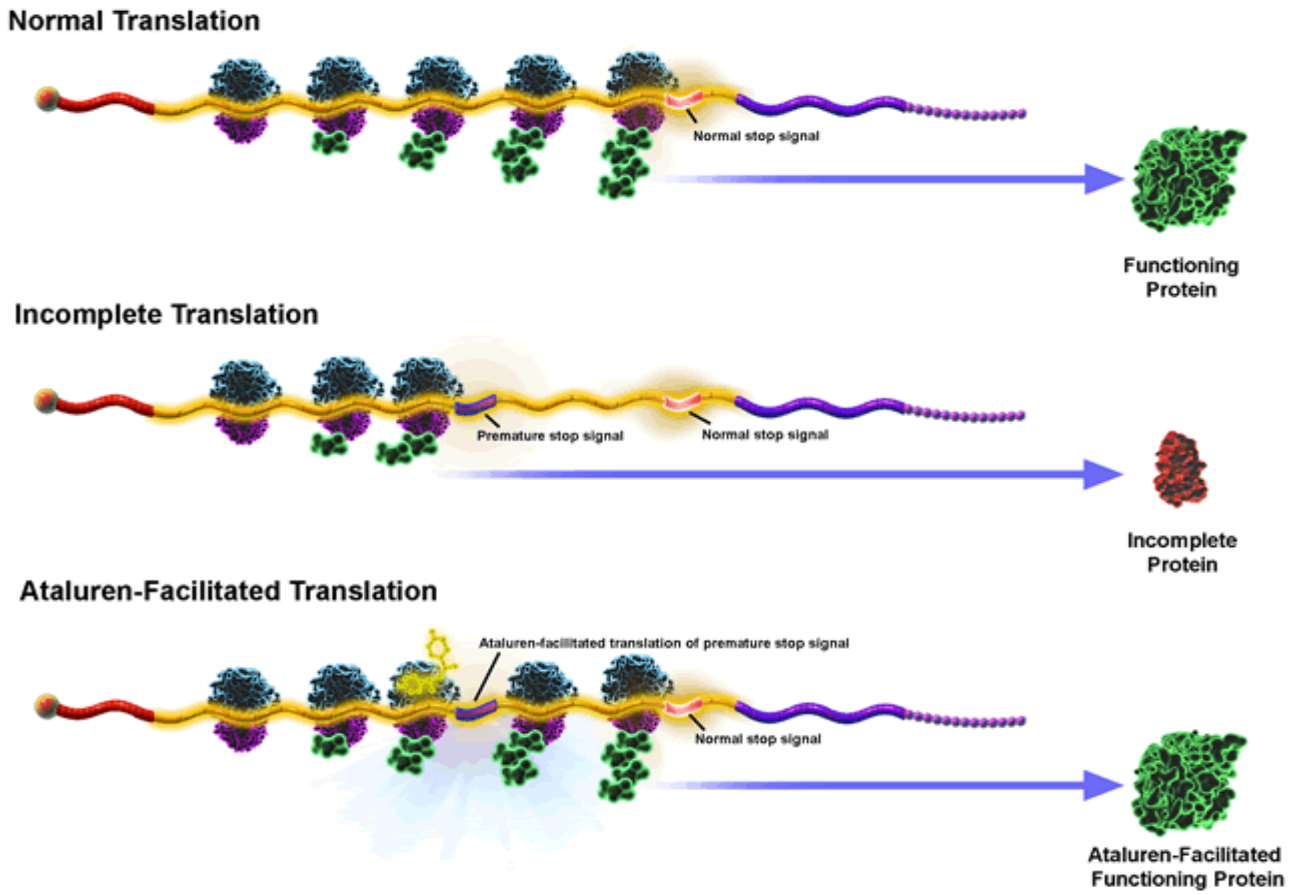
Anton Schmitz and Michael Famulok





PTC124 lega la subunità ribosomiale , determinando una modificazione conformazionale e consentendo al ribosoma di by-passare la presenza del codone di stop prematuro

Read through di codoni di stop prematuri - PTC124 (Ataluren)



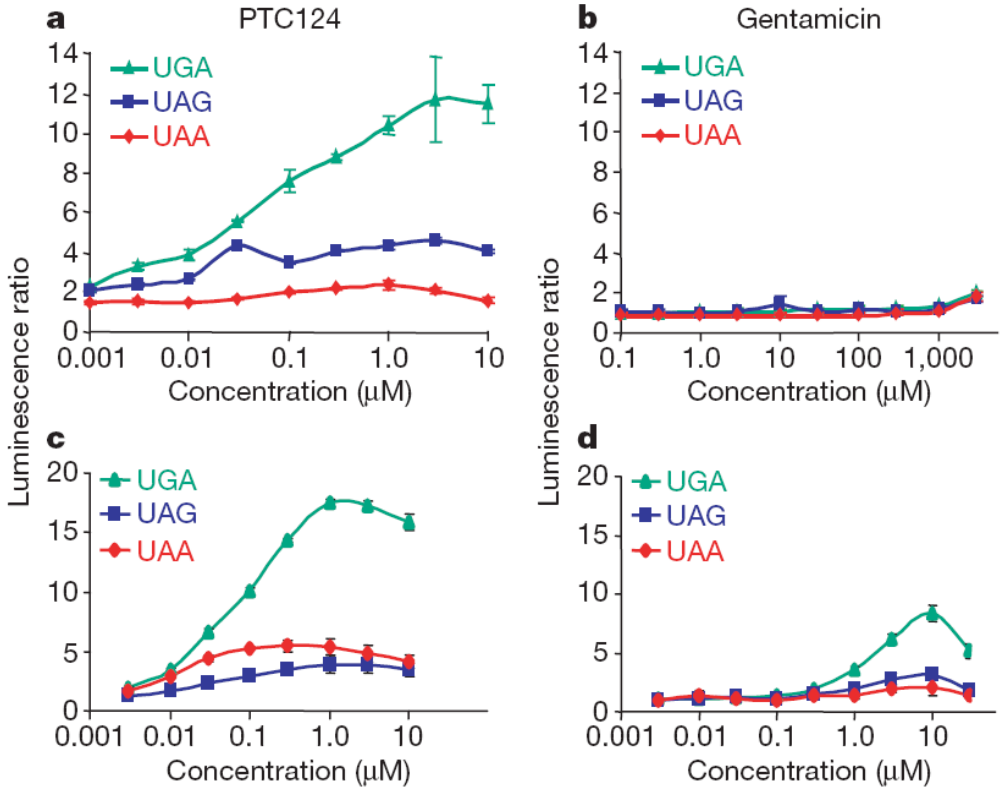
Studi preclinici: PTC124 consente la traduzione anche in presenza di codoni di stop prematuri (culture cellulari testate per attività di luciferasi)

Culture di cellule HEK293

PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations

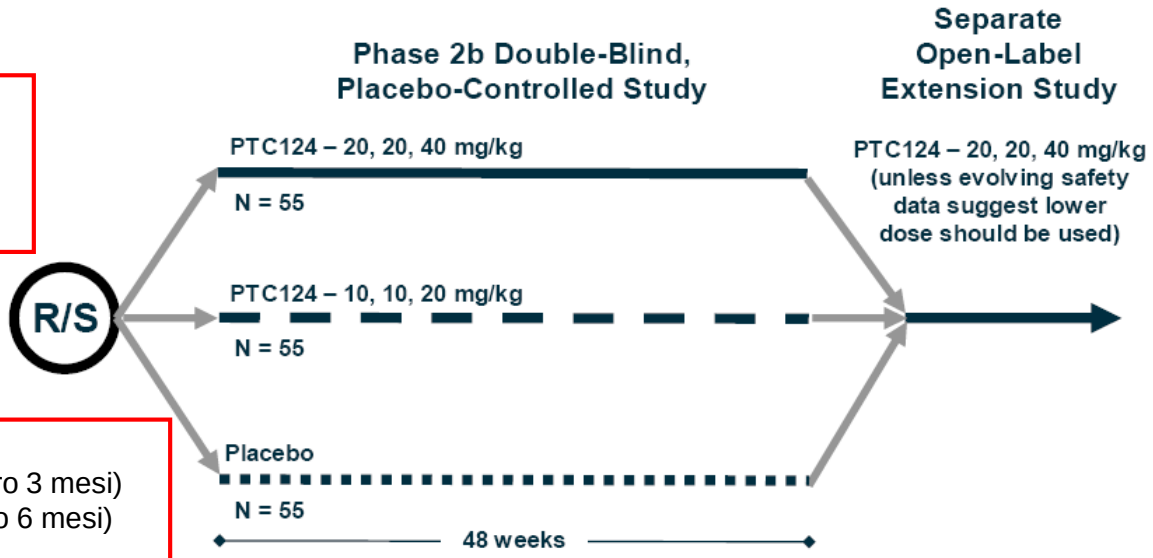
Ellen M. Welch[1]*, Elisabeth R. Barton[2]*, Jin Zhuo[1], Yuki Tomizawa[1], Westley J. Friesen[1], Panayiota Trifillis[1], Sergey Paushkin[1], Meenal Patel[1], Christopher R. Trotta[1], Seongwoo Hwang[1], Richard G. Wilde[1], Gary Karp[1], James Takasugi[1], Guangming Chen[1], Stephen Jones[1], Hongyu Ren[1], Young-Choon Moon[1], Donald Corson[1], Anthony A. Turpoff[1], Jeffrey A. Campbell[1], M. Morgan Conn[1], Atiyya Khan[1], Neil G. Almstead[1], Jean Hedrick[1], Anna Mollin[1], Nicole Risher[1], Marla Weetall[1], Shirley Yeh[1], Arthur A. Branstrom[1], Joseph M. Colacino[1], John Babiak[1], William D. Ju[1], Samit Hirawat[1], Valerie J. Northcutt[1], Langdon L. Miller[1], Phyllis Spatrick[3], Feng He[3], Masataka Kawana[2], Huisheng Feng[2], Allan Jacobson[3], Stuart W. Peltz[1] & H. Lee Sweeney[2]

Vol 447|3 May 2007|doi:10.1038/nature05756



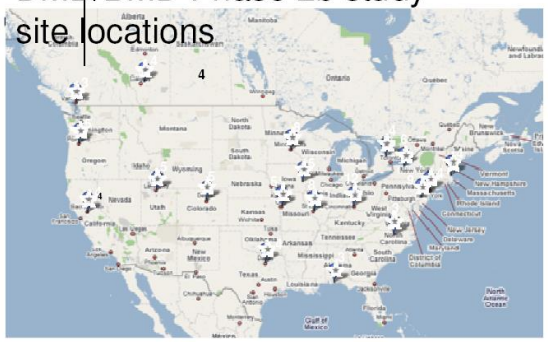
Caratteristiche generali dello studio con PTC124 fase 2b

CRITERI DI INCLUSIONE:
-Presenza di mutazione nonsenso
-Età maggiore 5 anni
-Deambulazione possibile per più di 75 m



CRITERI ESCLUSIONE
- Recente trattamento con aminoglicosidi (entro 3 mesi)
- Recente introduzione terapia steroidea (entro 6 mesi)
- Recenti modifiche terapia cardiologica
- Terapia con anticoagulante (entro 1 mese)
- Recenti interventi chirurgici (entro 1 mese)
- Terapia immunosoppressiva
- Precedente trattamento con PTC124

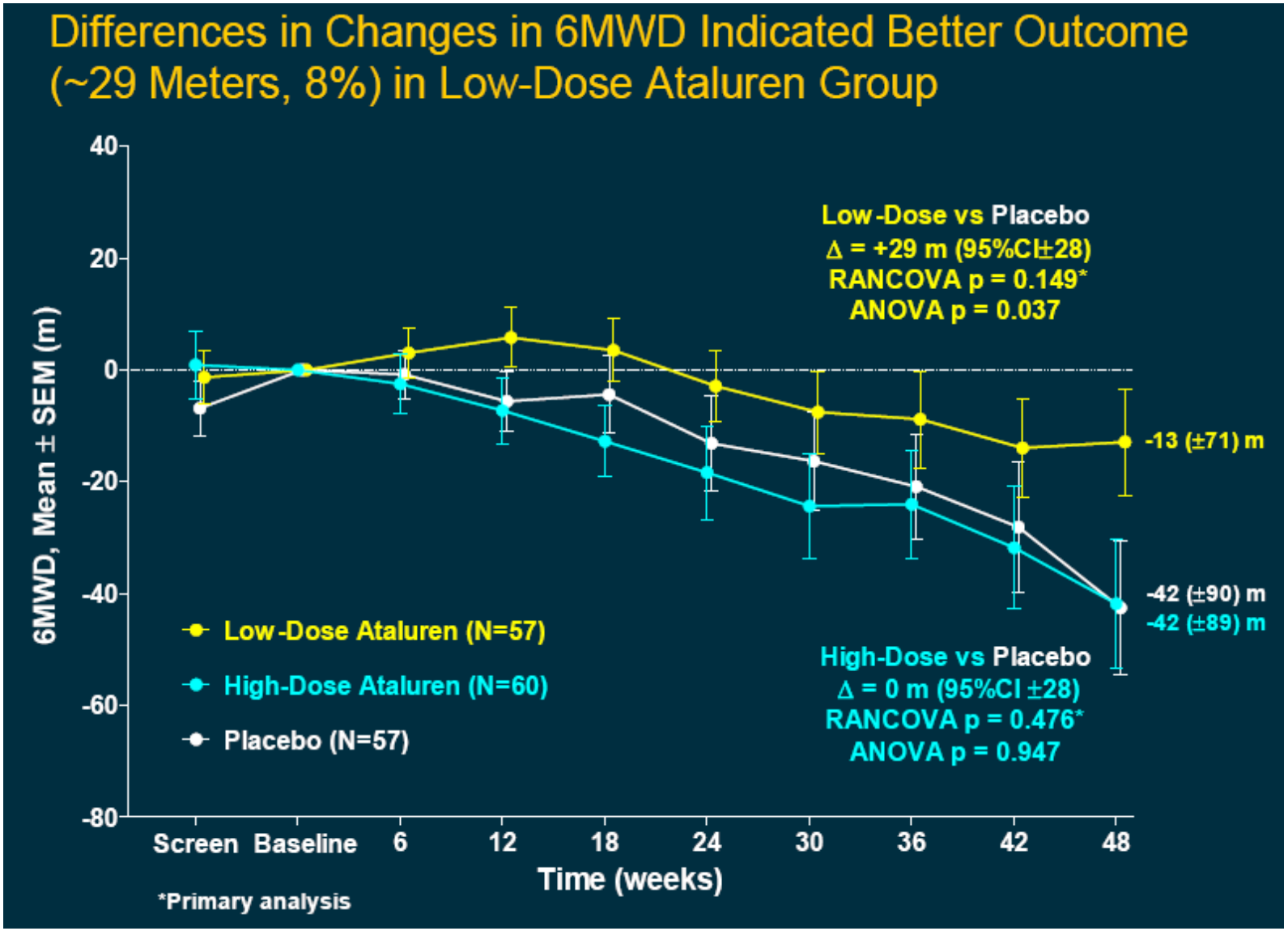
DMD/BMD Phase 2b study site locations



DMD/BMD Phase 2b study site locations

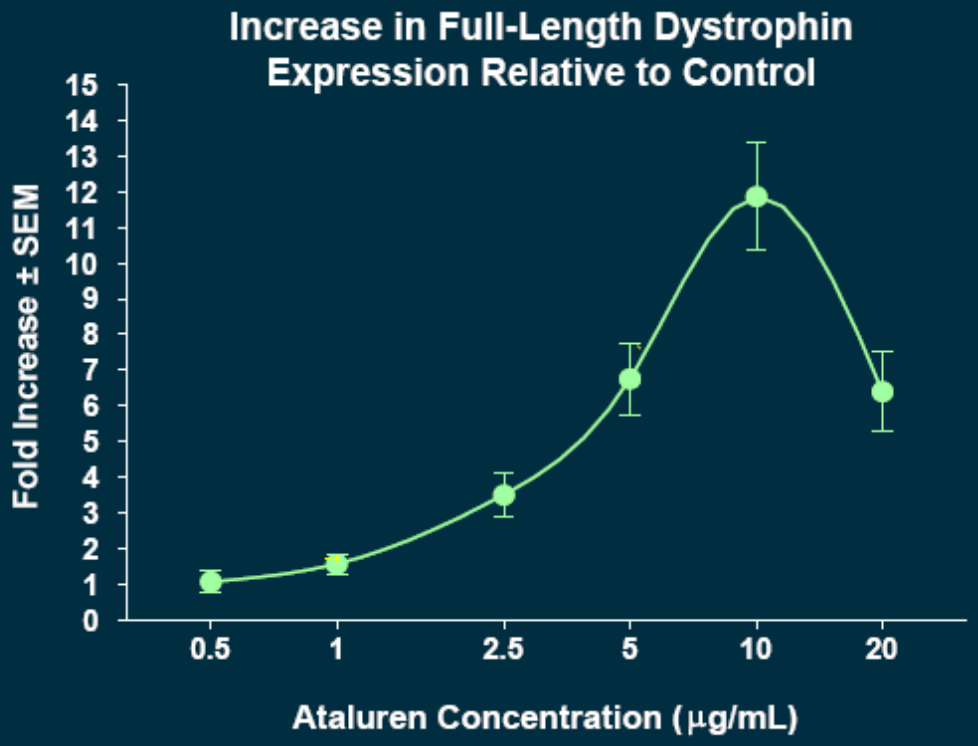
Countries:
- Australia, Belgium, Canada, France, Germany, Israel, Italy, Spain, Sweden, US, UK

6MWT – differenze tra differenti dosaggi



PTC124 – Curva dose-risposta

Human Myocyte Data Suggest a Bell-Shaped Ataluren Dose-Response Curve for Dystrophin Expression



Myocytes from Phase 2a DBMD patients (N=29) cultured in vitro with ataluren for 12 days

[Lee Sweeney – unpublished data]

Effectiveness of PTC124 treatment of cystic fibrosis caused by nonsense mutations: a prospective phase II trial

Eitan Kerem, Samit Hirawat, Shoshana Armoni, Yasmin Yaakov, David Shoseyov, Michael Cohen, Malka Nissim-Rafinia, Hannah Blau, Joseph Rivlin, Micha Aviram, Gary L Elfring, Valerie J Northcutt, Langdon L Miller, Batsheva Kerem, Michael Wilschanski

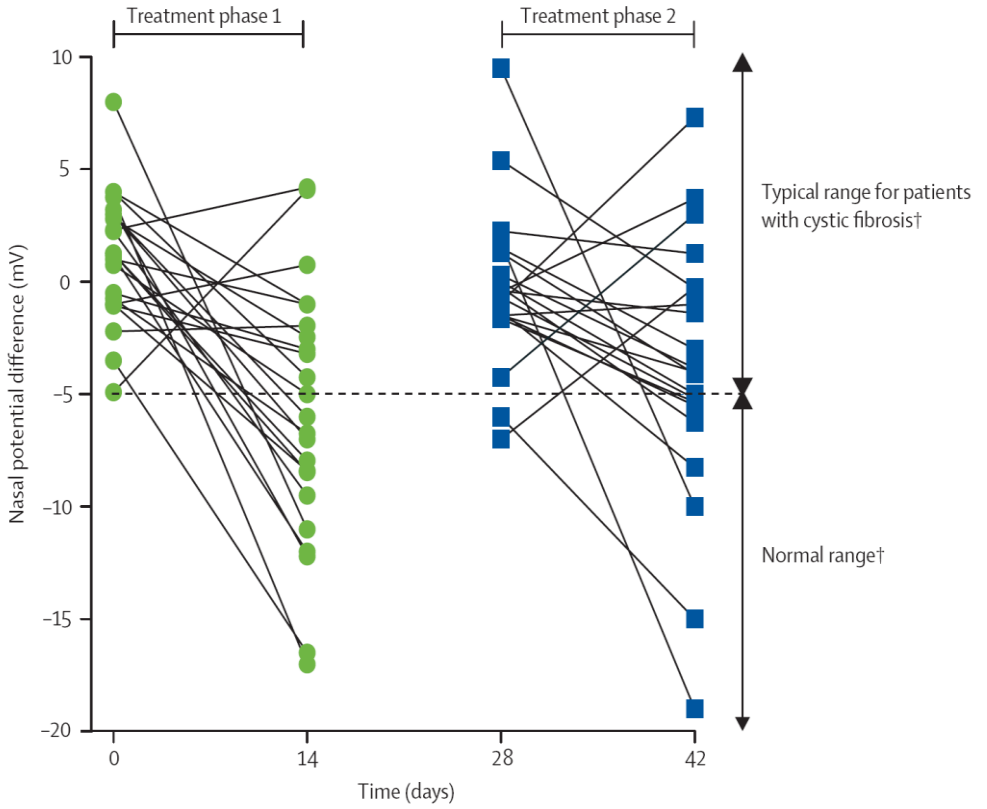
thelancet.com **Vol 372 August 30, 2008**

	N=23
Age (years)	25 (18 to 56)
Sex (male)	11 (48%)
Bodyweight (kg)	58 (36 to 83)

	Cycle 1 (n=23)	p value	Cycle 2 (n=21)	p value
Primary outcome measures				
Patients with nasal PD within normal range* at baseline	0		2 (10%)	
Patients with nasal PD within normal range* at end of treatment	13 (57%)	0·0003†	9 (43%)	0·02†
Change in total chloride transport (mV)	−7·1 (7·0)	<0·0001‡	−3·7 (7·3)	0·032‡
Total chloride transport response§	16 (70%) (90% CI 50–85)	<0·0001¶	8 (38%) (90% CI 21–58)	<0·0001¶
Secondary outcome measures				
Change in basal nasal PD (mV)	+3·3 (7·3)	0·04‡	+3·1 (9·0)	0·13‡
Change in sodium transport (mV)	−1·9 (8·8)	0·32‡	−2·0 (9·7)	0·36‡
Change in intrinsic chloride transport (mV)	−3·3 (2·8)	0·002‡	−1·1 (6·1)	0·43‡
Change in stimulated chloride transport (mV)	−3·8 (3·8)	<0·0001‡	−2·6 (3·3)	0·002‡
Change (Δ) in total PD (mV)	−8·9 (7·3)	<0·0001‡	−5·7 (8·6)	0·007‡

Data are number (%) or mean (SD) unless otherwise specified. *Equal to or more electrically negative than −5 mV. †McNemar's test to compare end-of-treatment value with corresponding baseline value. ‡Paired *t* test to compare end-of-treatment value with corresponding baseline value. §A change of at least −5 mV in nasal transepithelial potential difference (PD). ¶χ^2 test to compare observed response rate with null-hypothesis response rate of 10%.

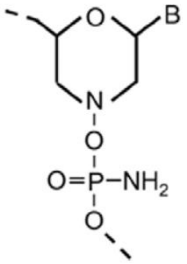
Table 3: **Changes in primary and secondary measures of nasal potential difference (PD)**

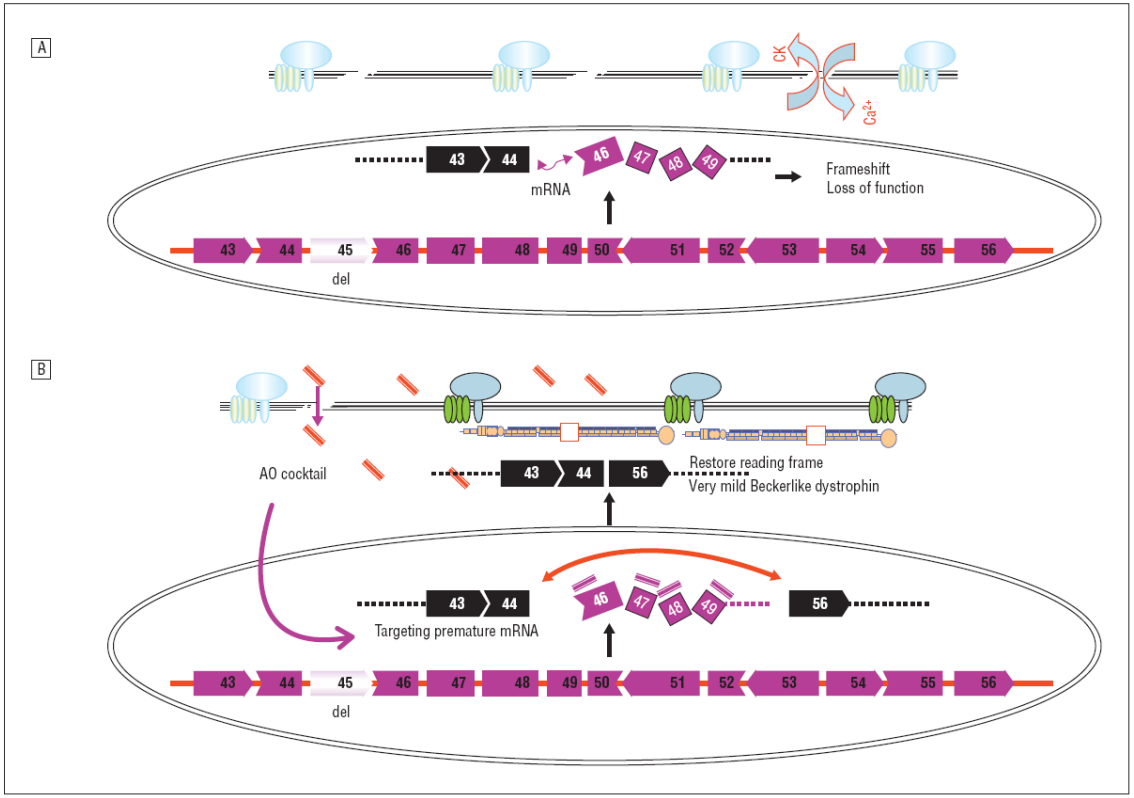


- 4 +4+8 mg/Kg
- 10+10+20 mg/Kg

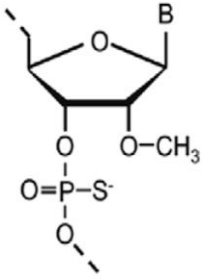
EXON SKIPPING

Phosphorodiamidate morpholino oligonucleotides (PMOs) (AVI-4658; AVI-Biopharma)





Phosphorothioate oligonucleotides (PRO051 Prosensa)



NEUROLOGICAL REVIEW

A Renaissance for Antisense Oligonucleotide Drugs in Neurology

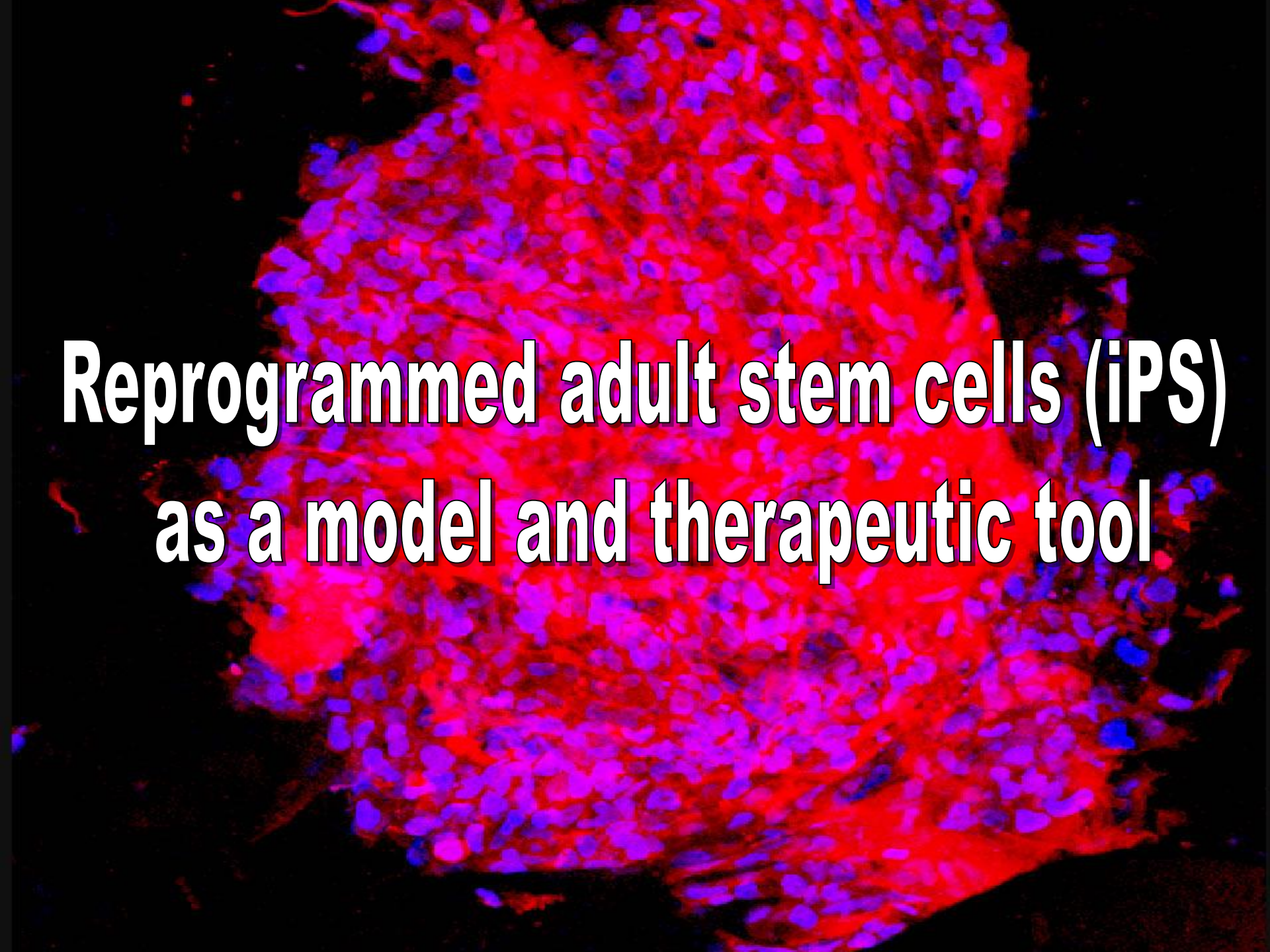
Exon Skipping Breaks New Ground

Toshifumi Yokota, PhD; Shin'ichi Takeda, MD, PhD; Qi-Long Lu, MD, PhD; Terence A. Partridge, PhD; Akinori Nakamura, MD, PhD; Eric P. Hoffman, PhD

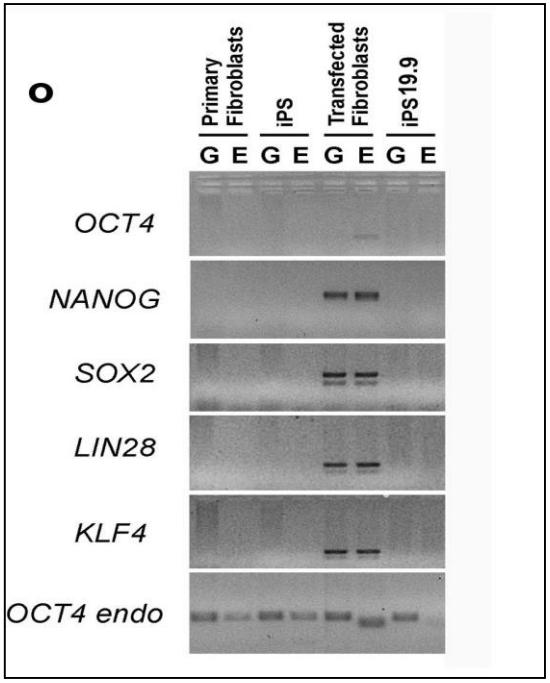
Studio clinico di fase III, randomizzato, doppio cieco, versus placebo per determinare efficacia e sicurezza di GSK2402968 (PRO051) in pazienti deambulanti affetti da DMD

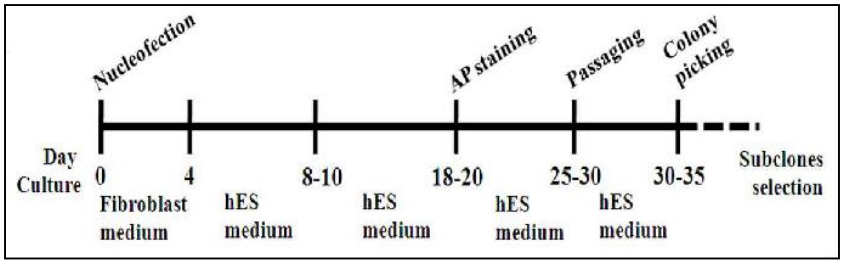
• 180 pazienti (arruolamento di almeno 163 soggetti, considerando drop-out del 10%)
• 6 mg/kg vs placebo (2:1)
• 48 settimane
• Somministrazione settimanale sottocute da effettuarsi presso il centro di riferimento per i primi 2 mesi.

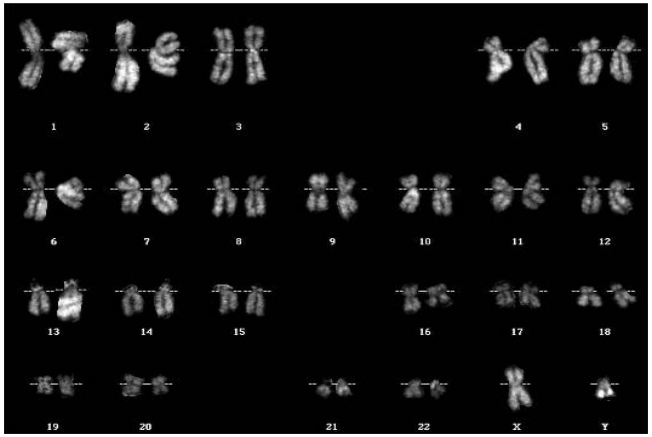
•ENDPOINT PRIMARIO: modificazioni nel 6MWT
• Miglioramento di 30 m con deviazione standard di 55 m

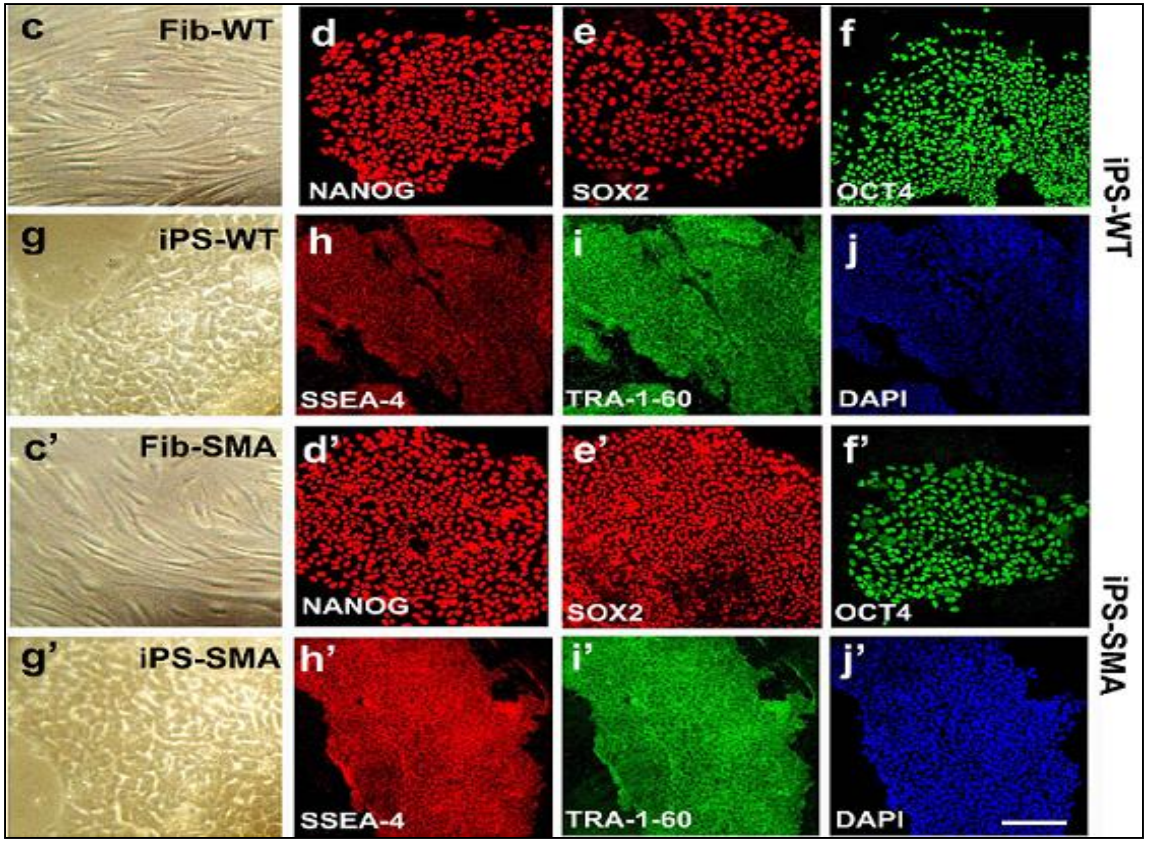

Reprogrammed adult stem cells (iPS)
as a model and therapeutic tool

Reprogramming human fibroblasts of a SMA patient and his father without genomic vector integration and selection of iPS clones

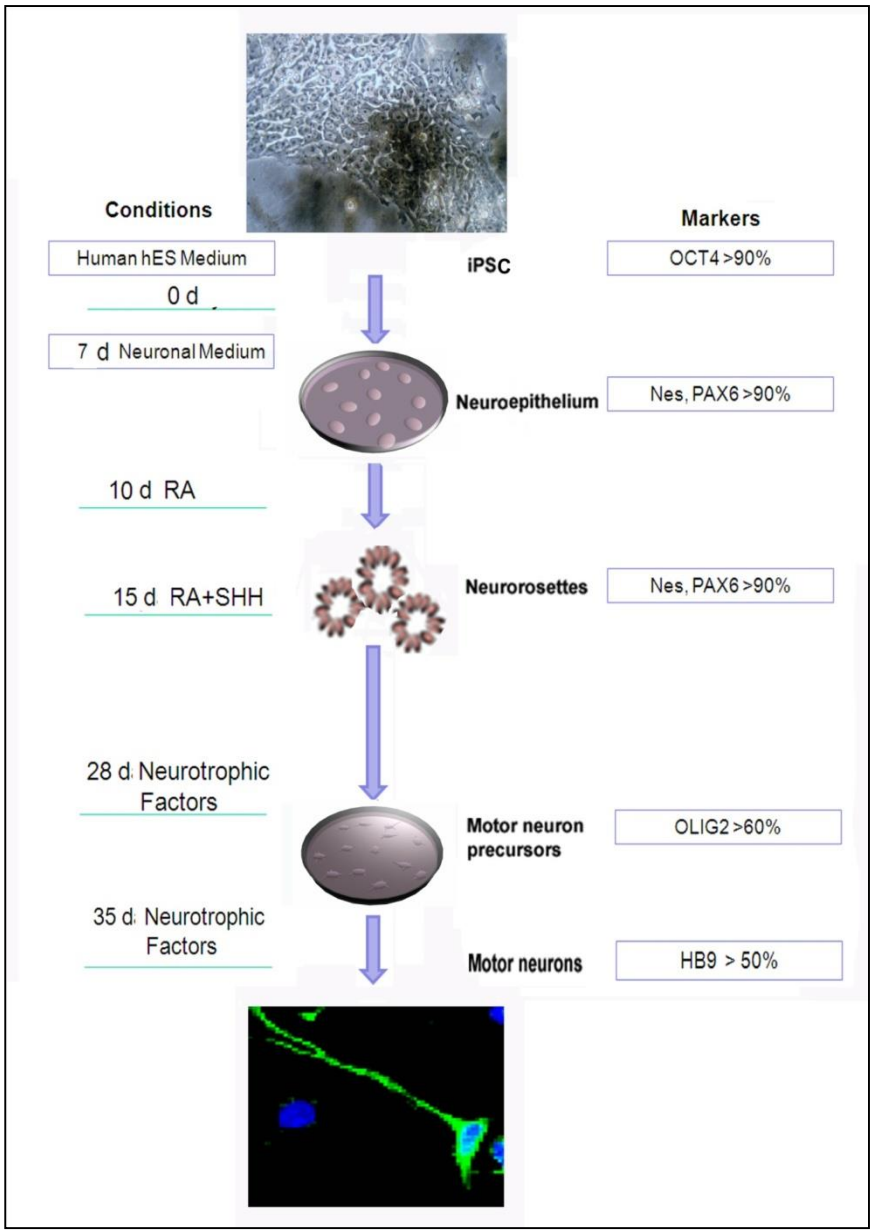


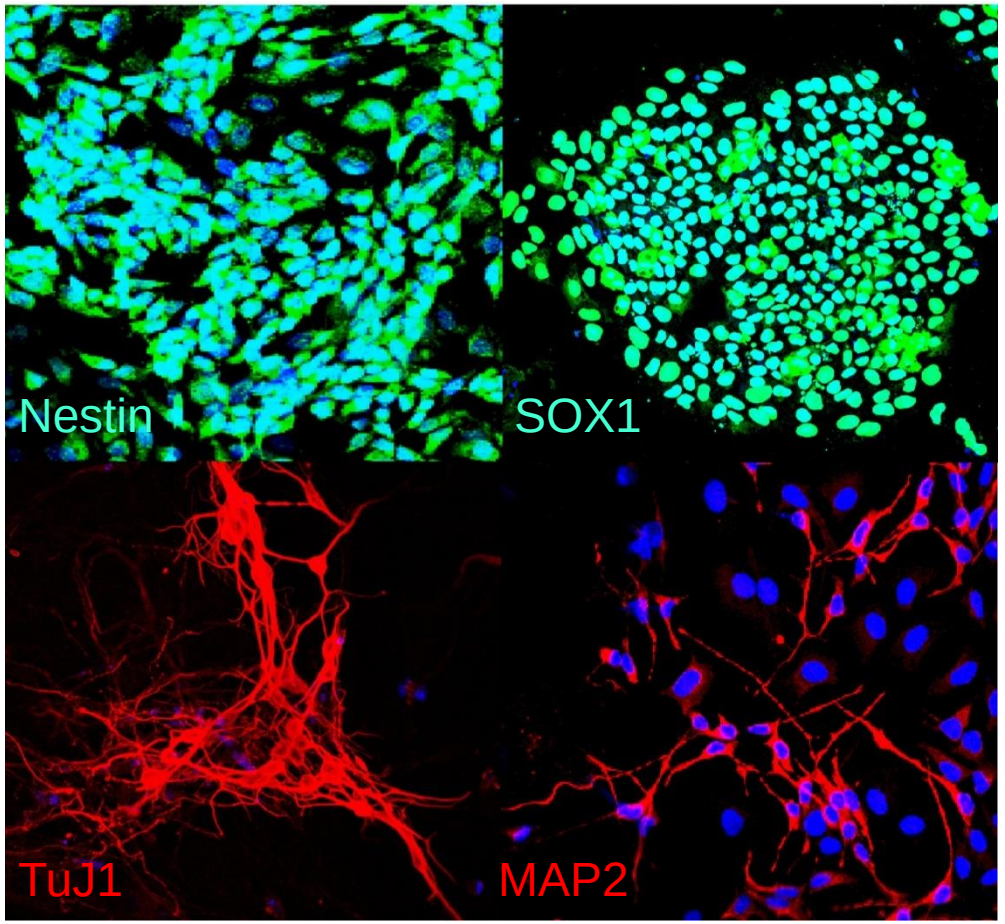






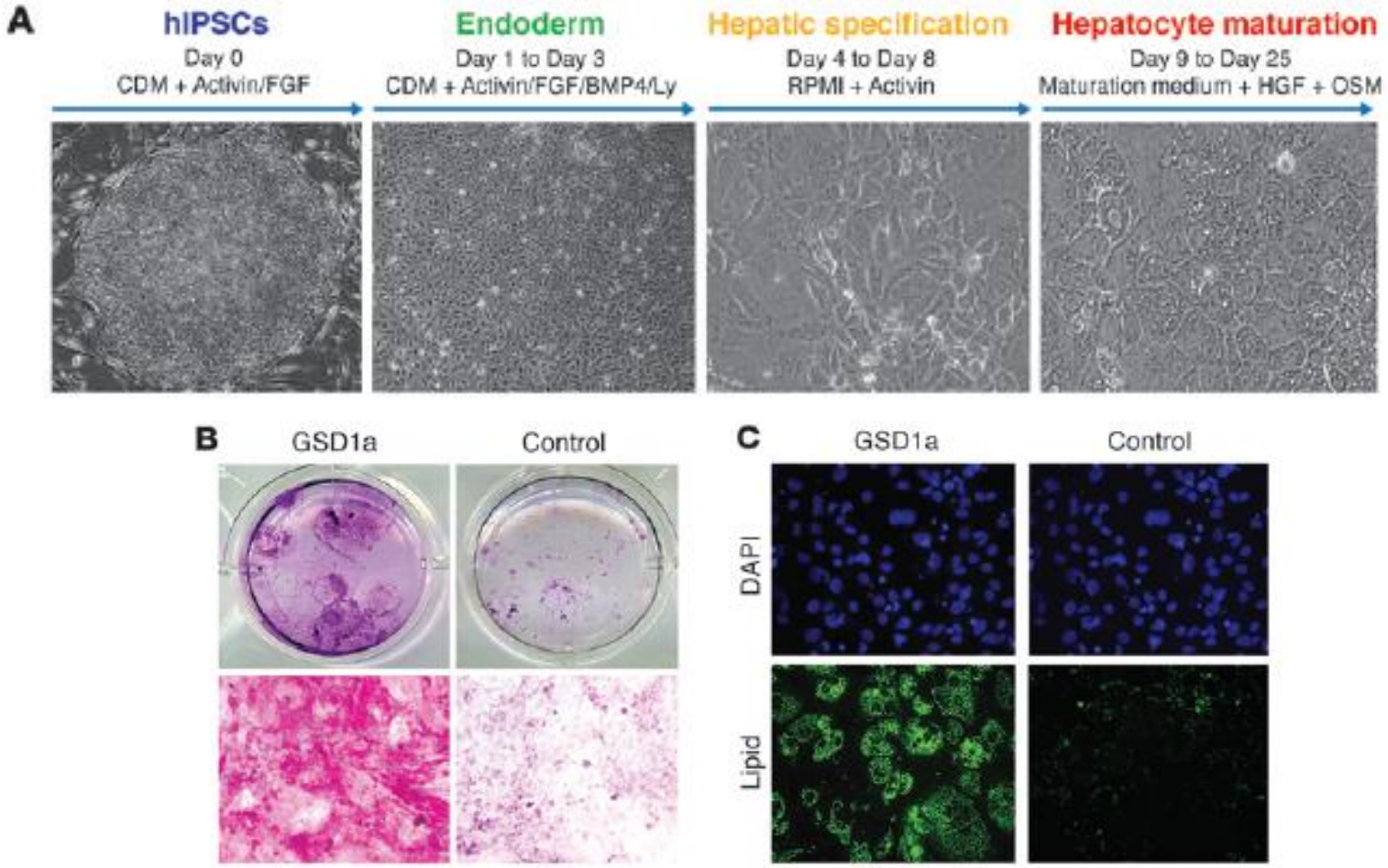
Motor neuronal differentiation





Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells

S. Tamir Rashid,[1,2] Sebastien Corbineau,[1,3] Nick Hannan,[1] Stefan J. Marciniak,[2] Elena Miranda,[2,4] Graeme Alexander,[5] Isabel Huang-Doran,[6] Julian Griffin,[6] Lars Ahrlund-Richter,[7] Jeremy Skepper,[8] Robert Semple,[6] Anne Weber,[3] David A. Lomas,[2] and Ludovic Vallier[1]



Genetics and biochemistry Lab
Department of Neurological Sciences

Giacomo P. Comi
Nereo Bresolin

Francesca Magri
Michela Ranieri
Alessandra Govoni
Francesco Fortunato
Andreina Bordoni
Roberto Del Bo
Sabrina Lucchiari
Dario Ronchi
Domenica Saccomanno
Daniela Piga
Serena Pagliarani
Gianna Ulzi
Mafalda Rizzuti

Neural Stem Lab

Stefania Corti
Monica Nizzardo
Sabrina Salani
Chiara Donadoni
Martina Nardini
Chiara Simone
Marianna Falcone
Giulietta Riboldi
Federica Rizzo