

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA



***CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA - XXXVI CICLO DI
SCIENZE PEDIATRICHE – DIPARTIMENTO DI
NEUROSCIENZE, RIABILITAZIONE, GENETICA E SCIENZE
MATERNO-INFANTILI***

***UOC NEUROLOGIA PEDIATRICA E MALATTIE MUSCOLARI
UOSD MILOGIA TRASLAZIONALE E SPERIMENTALE***

Tesi di Dottorato

**“SMA 2.0: NUOVE STRATEGIE PER UNA NUOVA
MALATTIA.”**

RELATORE: *Prof. Claudio Bruno*

CANDIDATA: *Dr. Noemi Brolatti*

DIRETTORE DEL CORSO DI DOTTORATO: *Prof. Pasquale Striano*

Indice:

OBIETTIVI DEL DOTTORATO DI RICERCA	2
BACKGROUND	3
1. Atrofia Muscolare Spinale (SMA): Presentazione clinica e storia naturale	3
1.1 Standard di cure.....	9
2. Terapie specifiche per la SMA	11
2.1 Modulatore dello splicing.....	13
2.1.1 Nusinersen.....	13
2.1.2 Risdiplam.....	15
2.2 Terapia genica.....	17
2.2.1 Zolgensma.....	17
3. Screening neonatale	18
RISULTATI OTTENUTI	
4. Pazienti affetti da atrofia muscolare spinale di tipo I trattati con Nusinersen: 4 anni follow-up	20
4.1 Materiali e metodi.....	20
4.2 Risultati.....	21
4.3 Discussione.....	27
5. Pazienti SMA1 trattati con Risdiplam a confronto con la storia naturale	29
5.1 Materiali e metodi.....	32
5.2 Risultati.....	33
5.3 Discussione.....	36
6. Terapia genica: predittori di efficacia e sicurezza in pazienti SMA 1 naive precedentemente trattati con altre terapie	37
6.1 Materiali e metodi.....	37
6.2 Risultati.....	39
6.3 Discussione.....	51
7. La pletismografia a luce strutturata per la valutazione non invasiva del pattern respiratorio nell'atrofia muscolare spinale di tipo 1	54
7.1 Materiali e metodi.....	55
7.2 Risultati.....	62
7.3 Discussione.....	66
CONCLUSIONI	68
BIBLIOGRAFIA	70

OBIETTIVI DEL DOTTORATO DI RICERCA

L'arrivo delle nuove terapie ha prodotto un significativo cambiamento nella storia naturale dell'atrofia muscolare spinale (SMA). L'utilizzo delle nuove molecole: nusinersen, risdiplam e onasemnogene abeparvovec nella SMA di tipo 1 ha portato un netto miglioramento della sopravvivenza e delle abilità motorie in questi pazienti. Con l'aumento dell'aspettativa di vita i bambini SMA mostrano nuovi fenotipi clinici, presentando cambiamenti non solo nell'aspetto motorio, ma anche in ambito respiratorio; tuttavia, mancano ancora strumenti oggettivi e ripetibili per valutare la funzione respiratoria, soprattutto in considerazione della giovane età e della scarsa collaborazione di bambini SMA 1.

1. Obiettivo primario dello studio è stato studiare gli effetti dei diversi approcci terapeutici nei pazienti SMA 1, in un setting di *Real Word*, valutando la sicurezza e l'efficacia dei nuovi farmaci e analizzando i cambiamenti dell'aspetto motorio, respiratorio e bulbare. Sono stati, inoltre, ricercati fattori in grado di influenzare l'efficacia delle terapie.
2. Obiettivo secondario è stato ricercare nuovi strumenti diagnostici per studiare e caratterizzare in modo approfondito l'aspetto respiratorio. Proponiamo la pletismografia a luce strutturata come nuovo strumento di valutazione specialistico ed accurato in grado di descrivere in modo dettagliato il pattern respiratorio di pazienti SMA 1.

BACKGROUND

1. Atrofia Muscolare Spinale (SMA): Presentazione clinica e storia naturale

L'atrofia muscolare spinale (*spinal muscular atrophy*, SMA) è una patologia neuromuscolare caratterizzata dalla degenerazione degli alfa-motoneuroni delle corna anteriori del midollo spinale, con conseguenti ipostenia ed ipotrofia muscolare progressive.

È una malattia rara, il cui meccanismo eziopatogenetico è determinato da una mutazione nella regione q11.2-q13.3 del cromosoma 5, che colpisce il gene *survival of motor neuron 1 (SMN 1)* necessario per il mantenimento e la sopravvivenza dei motoneuroni. La trasmissione è autosomica recessiva e la frequenza dello stato di portatore varia da 1/36 a 1/54 in relazione alla zona geografica, con incidenza di 1/7000 nati vivi e costituisce la più comune causa genetica di morte infantile [1].

La mutazione causativa è nel 97% dei casi la delezione dell'esone 7 del gene SMN 1, che può essere associata o meno alla delezione dell'esone 8 (Fig. 1). In alcuni rari casi (circa il 4%) la malattia è determinata da eterozigosi composta e quindi da delezione su un allele e mutazione puntiforme sull'altro.

Nel segmento centromerico del cromosoma 5 è, inoltre, presente un numero variabile di copie di un gene "back-up", simile a *SMN 1*, chiamato *survival of motor neuron 2 (SMN 2)*, il quale produce una proteina analoga, ma non funzionante. Essa differisce da *SMN 1* per 9 nucleotidi: la sostituzione del nucleotide C con nucleotide T. nell'esone 7 è funzionalmente significativa ed è responsabile della produzione di una proteina tronca (Fig.1). Il gene SMN1 produce una proteina completa di 294 amminoacidi, mentre SMN2 produce un trascritto che per il 90% dei casi determina una proteina tronca e nel 10% dei casi la proteina completa.

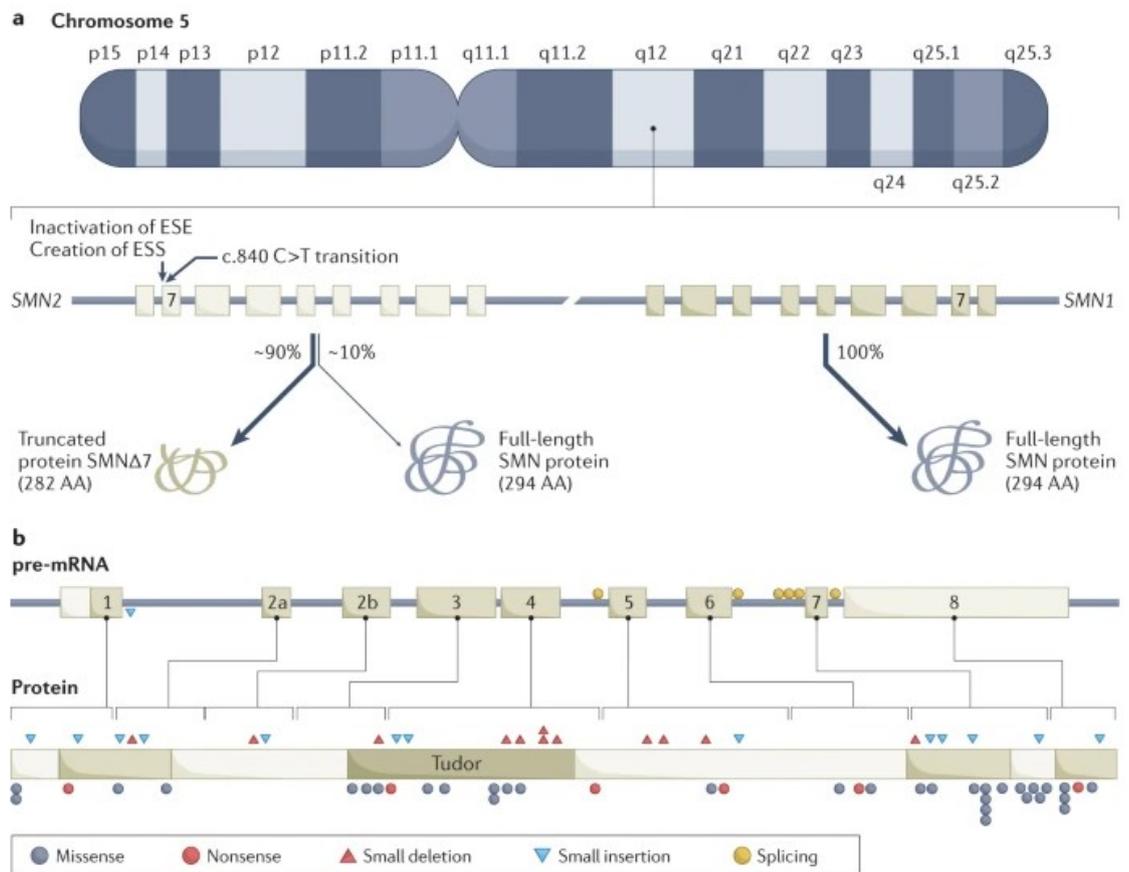


Figura 1: (a) I pazienti con atrofia muscolare spinale presentano delezioni o mutazioni puntiformi in entrambe le copie del gene *SMN1*. Una sostituzione da C a T nell'esone 7 di *SMN2* inattiva il meccanismo di splicing che porta a saltare l'esone 7 durante la trascrizione e, quindi, la produzione di una proteina tronca e non funzionale. Tuttavia, una piccola quantità (~10%) di mRNA completo viene prodotta da *SMN2*, dando luogo a una proteina SMN funzionale e completa. (b) I domini proteici di SMN, con le proteine a cui si lega e la posizione delle varie mutazioni nell'uomo. (rif.201, Elsevier. Mercuri et al. *Spinal muscular Atrophy, Nature Reviews Disease Primers* **volume 8**, Article number: 52-2022).

Il numero di copie di *SMN 2* è un valido biomarker predittivo della severità di malattia [2,3]. Un maggior numero di copie del gene *SMN2* è associato ad un fenotipo più lieve (Fig. 2).

SMN2 copy number			
	SMA 1	SMA 2	SMA 3
1	96%	4%	0%
2	79%	16%	5%
3	15%	54%	31%
4	1%	11%	88%

Figura 2: associazione numero di copie con sottotipo di SMA (Adam, Margaret P, et al., editors. GeneReviews®. University of Washington, Seattle, 1993.)

La SMA è convenzionalmente classificata in 5 fenotipi sulla base dell'età d'esordio e delle abilità motorie acquisite (Tab. 1) [1]. La severità del fenotipo in genere correla con l'età di esordio e con il numero di copie di *SMN 2* (Tab. 1) [2,3].

TIPO DI SMA	ETÀ ESORDIO	ABILITÀ MOTORIA ACQUISITA	PROGNOSI	NUM COPIE SMN2
0	Vita intrauterina	Non acquisito nessuna tappa della tappa dello sviluppo	< 6mesi	80%:1-2 copie
1	0-6 mesi	Posizione seduta non acquisita	< 2 anni	80%:1-2 copie
2	7-18 mesi	Deambulazione acquisita	non Età adulta	>80%:3 copie
3	>18 mesi	Possibile deambulazione	Età adulta	96%:3-4 copie
4	2 [^] -3 [^] decade	Deambulazione fino all'età adulta	Età adulta	4 o più copie

Tabella 1 Classificazione della SMA

SMA tipo 0: la forma più grave e rara, ad esordio nella vita intrauterina e a decorso rapidamente fatale. La scarsa motilità nella vita intrauterina può causare la presenza di retrazioni articolari già alla nascita (*artrogriposi multipla congenita*); è importante porre evidenza su quest'ultimo aspetto poiché, in passato, la presenza di artrogriposi alla nascita era invece considerato un criterio di esclusione per la diagnosi di SMA.

SMA tipo 1: malattia di Werdnig-Hoffman, forma infantile a fenotipo grave e prognosi infausta in assenza di terapia. È la prima causa di decesso in età pediatrica per malattia genetica. L'esordio è nei primi mesi di vita (0-6 mesi) con ipotonia e ipostenia ingravescenti, riduzione della motricità spontanea e assenza dei riflessi osteotendinei (Fig. 3). Questi bambini non acquisiscono le fisiologiche tappe dello sviluppo motorio. Gli aspetti cognitivi al contrario sono perfettamente conservati.



Figura 3. Ipotonia severa generalizzata. 1a Assente controllo del capo alla trazione. 1b Ipotonia assiale alla sospensione ventrale.

La grave debolezza muscolare coinvolge anche la muscolatura respiratoria determinando entro i primi mesi dall'esordio l'instaurarsi di una progressiva insufficienza respiratoria cronica. In questi bambini il coinvolgimento della muscolatura respiratoria è caratterizzato da una preservazione della funzione diaframmatica; questo determina il cosiddetto "respiro paradossale" (collasso della parete toracica e protrusione addominale durante l'inspirazione) con conseguente deformità del torace cosiddetto "a campana" ("*bell shaped thorax*") (Fig. 4) [31,32].

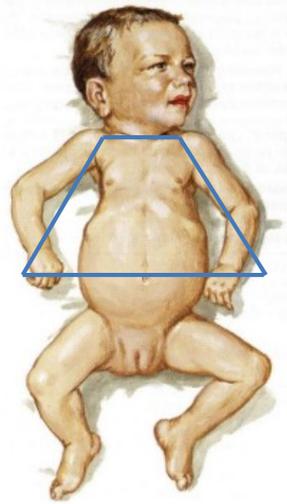


Figura 4. Rappresentazione torace a campana.

Già entro i primi mesi di vita i bambini affetti da SMA tipo 1 richiedono un supporto ventilatorio; in assenza di ventilazione meccanica l'exitus avviene entro i due anni di vita.

Spesso, a causa della grave ipotonia, anche la suzione e la deglutizione diventano deficitarie entro il primo anno di vita, determinando gravi problemi di nutrizione e un elevato rischio di inalazione e soffocamento durante il pasto. L'avvio di nutrizione enterale mediante sondino nasogastrico, e successivo il confezionamento della gastrostomia, diventano, quindi, fondamentali per aumentare la sopravvivenza in questi bambini migliorando la gestione quotidiana domiciliare.

Considerata l'ampia variabilità fenotipica nell'ambito di questo gruppo è stata definita un'ulteriore sotto-classificazione [22]:

- 1a: movimenti attivi fetali assenti, esordio nel primo mese di vita, assente controllo del capo, prognosi molto sfavorevole a causa delle precoci problematiche respiratorie.
- 1b: sintomi dopo il primo mese di vita, assente controllo del capo.
- 1c: sintomi dopo il primo mese di vita, acquisito il controllo del capo.

SMA tipo 2: malattia di Dubowitz. Esordio tra 6 e 18 mesi di età con ritardo nell'acquisizione delle tappe dello sviluppo motorio, posizione seduta autonoma possibile, ma deambulazione autonoma non possibile. Sono presenti in questa

popolazione problemi di tipo nutrizionale, respiratorio ad esordio più tardivo se confrontati con i bambini SMA1. Caratteristica della SMA 2 è il coinvolgimento ortopedico: la scoliosi rappresenta una problematica di grande rilievo, essa è causata dall'ipotonia dei muscoli paravertebrali che, in posizione seduta, non consente di sostenere il peso del tronco contro gravità. Il primo intervento terapeutico per arrestare la progressione della curva scoliotica è l'utilizzo del corsetto ortopedico [5]. Il sostegno dato da questo ausilio ortopedico, è, tuttavia, palliativo, e non è in grado di arrestare il peggioramento della deformità spinale (Fig. 5).

La soluzione risolutiva è la correzione chirurgica mediante l'intervento di artrodesi vertebrale: la curvatura scoliotica di un angolo di Cobb maggiore $\geq 50^\circ$ e/o velocità di progressione $\geq 10^\circ$ all'anno sono i criteri per cui è indicato un approccio chirurgico per arrestare la progressiva deformità della gabbia toracica.



Figura 5: Rx colonna rappresentativa della curva scoliotica a C (A) e ad S (B) in pazienti affetti da SMA

SMA tipo 3: malattia di Kugelberg-Welander, forma giovanile. Esordio dopo i 18 mesi di vita. La deambulazione autonoma viene inizialmente acquisita, successivamente la progressiva debolezza muscolare determina la perdita di questa capacità motoria. Le problematiche di tipo respiratorio, nutrizionale sono meno frequenti; nei pazienti con esordio della patologia prima dei 18 mesi le complicanze ortopediche e lo sviluppo della scoliosi possono essere simili alla popolazione SMA 2.

SMA tipo 4: forma dell'età adulta, con esordio nella seconda o terza decade e mantenimento della deambulazione autonoma per tutta la vita.

1.1 Standard di cura

L'atrofia muscolare spinale è considerata una malattia multi-sistemica, dallo spettro fenotipico diverso e complesso [4]. Di conseguenza, l'assistenza ai pazienti affetti da SMA richiede un approccio multidisciplinare.

Il “*Consensus Statement for Standard of Care in Spinal Muscular Atrophy*” del 2007 sottoposto a revisione e aggiornamento in occasione del “218th European Neuro Muscular Center, International Workshop: Revisiting the consensus on standards of care in SMA”, svolto in Olanda a febbraio 2016 [2], ha presentato gli standard di cura aggiornati per la gestione dell'aspetto respiratorio, ortopedico e nutrizionale nei pazienti SMA. Per molti anni essi hanno rappresentato le uniche possibilità terapeutiche di supporto e, nonostante lo sviluppo di terapie innovative, rivestono ancora oggi un ruolo fondamentale nella gestione del bambino affetto da SMA (Fig.6).

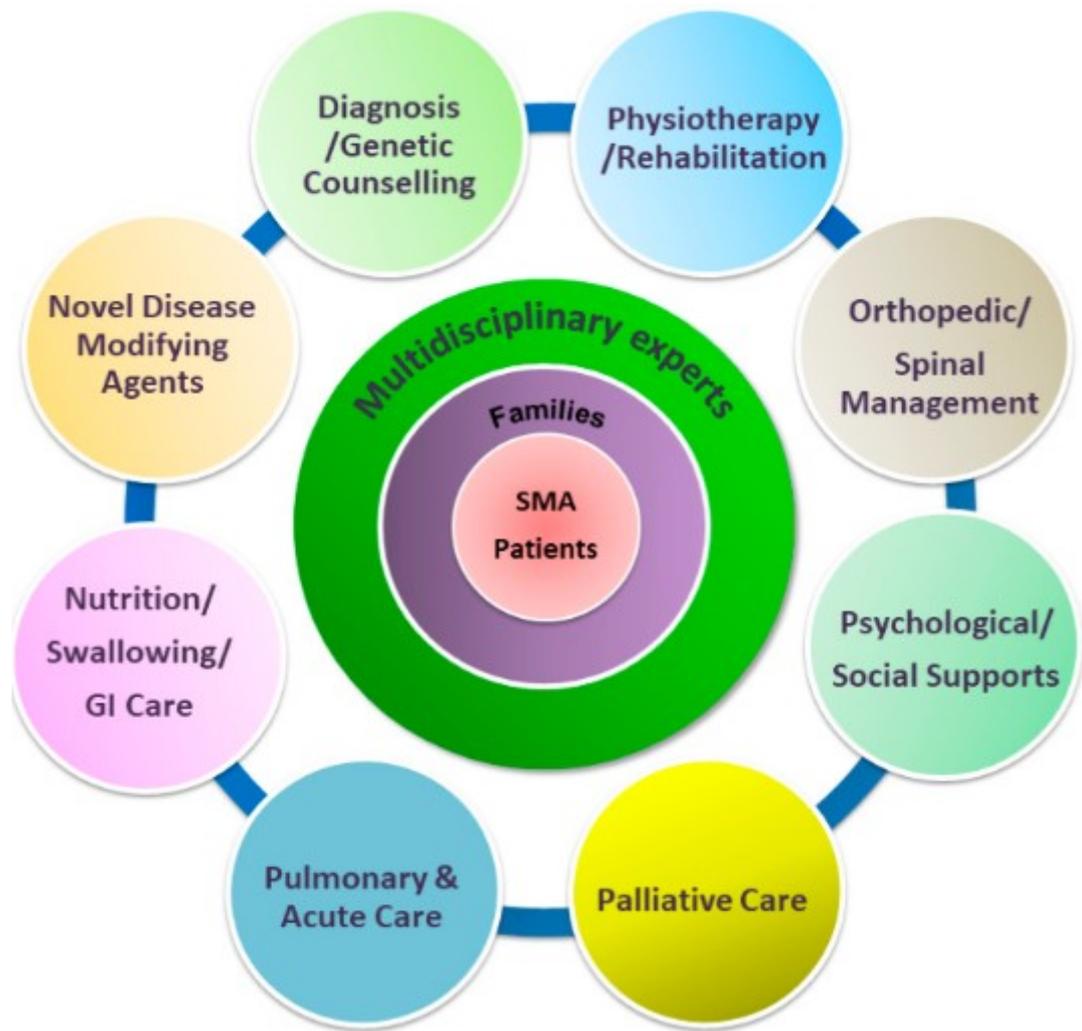


Figura 6. Approccio multidisciplinare della SMA. I nuovi farmaci modificanti la malattia e l'evoluzione della gestione multidisciplinare di supporto devono avvenire in modo concomitante per ottenere il miglior risultato possibile per il paziente SMA.

La valutazione dell'aspetto respiratorio e nutrizionale è fondamentale sia per migliorare la qualità della vita, sia per il prolungamento della sopravvivenza, specie nelle forme di tipo 1 con decorso più grave ed esito infausto. La diagnosi precoce di insufficienza respiratoria e il suo monitoraggio sono determinanti, in considerazione dell'alto tasso di morbilità e mortalità associati. L'utilizzo della ventilazione non invasiva (NIV) ha radicalmente modificato la prognosi di tale patologia, prolungando l'aspettativa di vita e riducendo la frequenza di necessità di intubazione e successivo confezionamento di tracheostomia [6].

Fondamentali sono le figure del fisiatra e del fisioterapista specializzato per sviluppare programmi mirati per mantenere o migliorare la forza muscolare residua, la flessibilità e l'equilibrio. I trattamenti fisioterapici settimanali agiscono anche sulla gestione della postura con il fine di prevenire o ritardare l'insorgere di deformità muscolari, quali ad esempio la scoliosi, aiutando il paziente a mantenere un certo grado di indipendenza nelle attività quotidiane.

L'aspetto nutrizionale e le problematiche di deglutizione devono essere attentamente valutate per cui le figure del gastroenterologo, nutrizionista e logopedista diventano indispensabili per fornire interventi per migliorare la sicurezza delle vie aeree durante la consumazione del pasto, per assicurare una nutrizione adeguata, con un adeguato intake calorico giornaliero.

L'obiettivo di questo approccio multidisciplinare è fornire cure olistiche, migliorare la qualità di vita, cercando di gestire le sfide uniche presentate dalla SMA1. La comunicazione e la collaborazione tra i membri del team sono fondamentali per garantire una gestione efficace e personalizzata di questa malattia complessa.

3. Terapie specifiche per la SMA

Le terapie innovative disponibili nell'ultimo decennio hanno letteralmente modificato la storia naturale della SMA; gli approcci terapeutici vengono suddivisi in:

- **Terapie SMN (Survival Motor Neuron) dipendenti**, che agiscono sui geni SMN1 e SMN2 e
- **Terapie SMN indipendenti**, che hanno come bersaglio terapeutico il motoneurone e il muscolo.

I farmaci che agiscono direttamente sul meccanismo genetico alla base della patologia (terapie SMN dipendenti) hanno due diverse modalità di azione:

1. Il trasferimento del gene SMN1 all'interno delle cellule del Sistema nervoso centrale attraverso un vettore adeno-virale in grado di passare la barriera emato-encefalica: **la terapia genica**
2. l'up-regolazione del gene SMN2 utilizzando oligonucleotidi anti-senso (ASO) **modulatori dello splicing**.

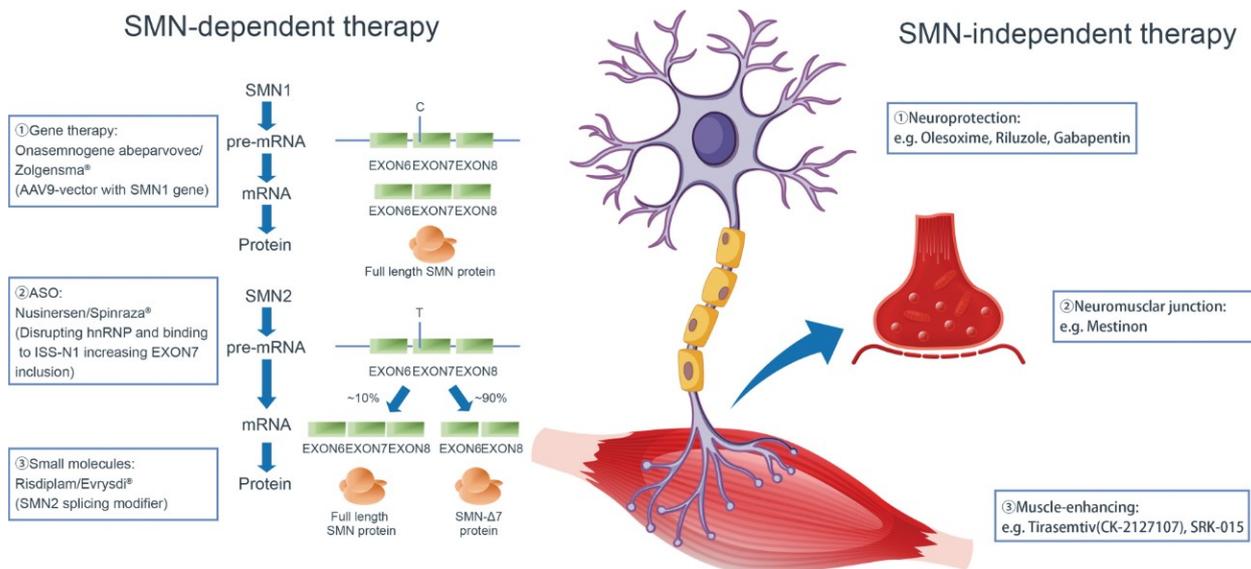


Figura 7. Panoramica delle strategie terapeutiche per il trattamento dell'atrofia muscolare spinale (Yueyi Li ,Hongyu Zeng, Yuhao Wei, Xuelei Ma, and Zhiyao HePublished Online:20 Mar 2023)

Altri approcci (terapie SMN indipendenti), possono avere diversi meccanismi d'azione come l'aumento della trascrizione del gene SMN2, la stabilizzazione della proteina SMN oppure possono agire con un meccanismo di neuroprotezione. Questi farmaci, studiati in passato, sebbene abbiano evidenziato risposte cliniche favorevoli in vitro e in modelli murini SMA transgenici, ad oggi, non hanno mostrato alcun beneficio clinico (Fig. 7); attualmente sono in corso ulteriori sperimentazioni cliniche per valutare la sicurezza e l'efficacia di altre molecole che agiscono direttamente sulla massa muscolare, quali, ad esempio, gli inibitori della miostatina.

La Tabella 2 illustra l'attuale stato di sviluppo di specifici farmaci

Drug	Sponsor	Mechanism of action	Route of application	Phase			FDA Approval	Comment
				I	II	III		
Splicing modification of SMN2:								
Nusinersen	Biogen-Ionis	Antisense-oligonucleotide	IT	x	x	x	x	Approval by FDA (Dec. 2016) and EMA (Jul. 2017) for all subtypes of SMA
RG7916 (Risdiplam)	Roche	Small molecule/splicing modifier	PO	x	x	(x)		SMA type 1: After 15 months of treatment independent sitting in 33%
LMI070 (Branaplam)	Novartis	Small molecule/splicing modifier	PO	x	x			Recruitment temporarily halted (safety concerns), now completed
Replacement of SMN1-gene								
AVXS-101 (Zolgensma)	Avexis/Novartis	AAV-9-Vector	IV	x	x	x	x	FDA approval for SMA patients <2 years of age (May 2019)
AVXS-101 (Zolgensma)	Avexis/Novartis	AAV-9-Vector	IT	x				Study in children <6 years of age with 3 SMN2-copies
Upregulation of muscle growth								
CK-2127107 (Reldesemtiv)	Cytokinetics	FSTA	PO	x	x			Mild improvement in 6MWT after 4–8 weeks of treatment in SMA 2 and 3
SRK-015	Scholar Rock	Myostatin Inhibitor	IV	x	x			Positive results in animal models
Neuroprotection								
Olesoxime	Hoffmann-La Roche	Apoptosis-inhibitor	PO	x	x			Development stopped in 2018

Tabella 2: nuovi sviluppi terapeutici per l'atrofia muscolare spinale

2.1 Modulatore dello splicing

2.1.1 Nusinersen

Il 5 maggio 2017 EMA (European Medicines Agency - EMA) ha approvato l'utilizzo di Nusinersen (Spinraza), il primo farmaco per il trattamento dell'atrofia muscolare spinale. Esso è un oligonucleotide antisense (ASO) che agisce legandosi a valle dell'esone 7 dell'SMN2 pre-RNA, consentendone la sua inclusione nel processo di trascrizione determinando, così, la sintesi di una proteina SMN2 completamente funzionale (Fig. 8). A causa della sua impossibilità di passare la barriera ematoencefalica, il farmaco deve essere somministrato per via intratecale, mediante l'esecuzione di una puntura lombare.

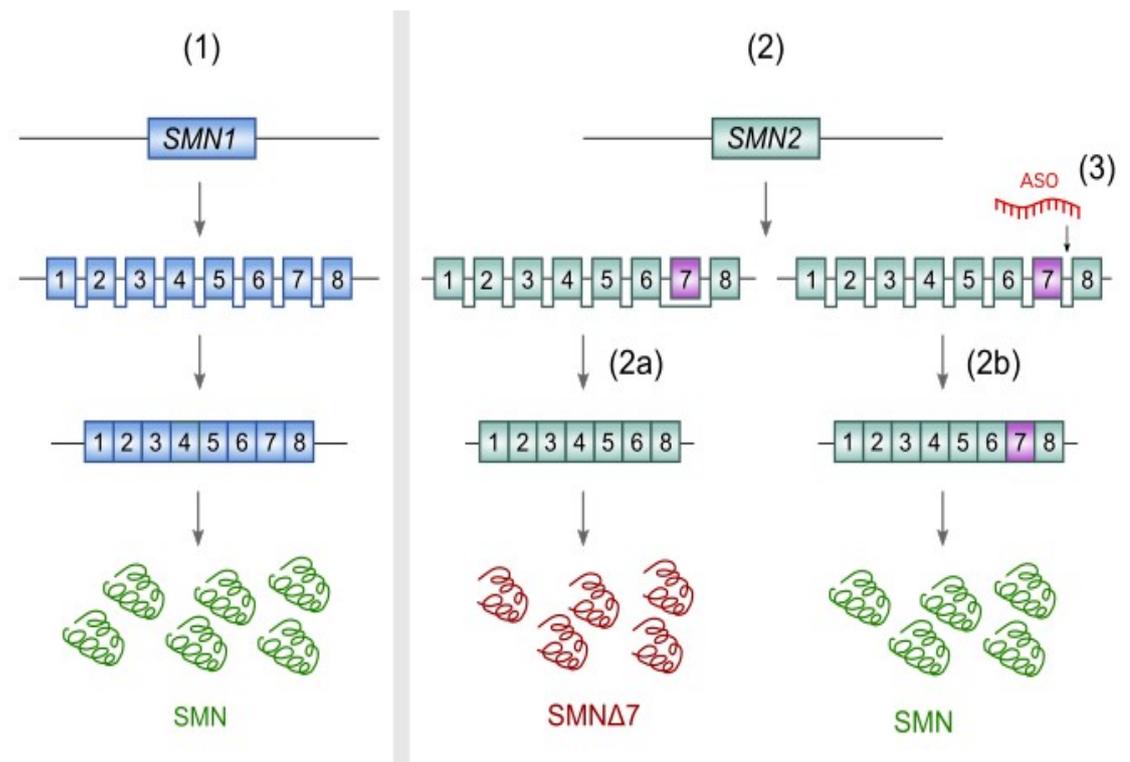


Figura 8: meccanismo di azione di Nusinersen: (1) gene *SMN1*, mancante nei pazienti affetti da SMA, (2) *SMN2* produttore di una proteina trunca e non funzionante, (2b) *SMN2* con sostituzione nucleotidica capace di produrre una proteina funzionale

Il programma di trattamento prevede quattro iniezioni intratecali durante un periodo di 2 mesi (dose da carico), seguite da infusioni di mantenimento ogni 4 mesi. Numerosi sono stati i trial clinici che ne hanno dimostrato la sicurezza e l'efficacia; nello specifico l'approvazione di Nusinersen come terapia è avvenuta dopo i risultati ottenuti in studi internazionali multicentrici di fase 3, randomizzati, in doppio cieco, controllati con placebo: ENDEAR condotto nei pazienti affetti da SMA tipo 1 e CHERISH nella SMA tipo 2. ENDEAR ha dimostrato come il trattamento con Nusinersen favorisca la sopravvivenza nei bambini sintomatici SMA1 rispetto ai pazienti non trattati. Lo studio è stato interrotto prematuramente quando le analisi ad interim hanno dimostrato un netto miglioramento nell'acquisizione delle tappe dello sviluppo psicomotorio nei pazienti trattati rispetto al gruppo placebo; è stata registrata una riduzione del 47% della mortalità e/o di necessità ventilazione oltre le 16 ore al giorno nei pazienti trattati rispetto al gruppo controllo.

Secondo lo studio condotto dal prof Mercuri: *Nusinersen versus sham control in later-onset spinal muscular atrophy* [9], la somministrazione di nusinersen si è rivelata utile anche nei bambini più grandi con esordio della SMA dopo i 6 mesi di età e trattati tra i 2 e i 12-15 anni. Il 57% dei pazienti inclusi nello studio ha mostrato miglioramento delle abilità motorie rispetto alla popolazione non trattata; la terapia intratecale conserva le tappe di sviluppo motorie acquisite in questi pazienti e interrompe il decorso progressivamente degenerativo che caratterizza questa patologia. [9-10].

In tutti questi studi Nusinersen si è dimostrato sicuro e ben tollerato, non sono stati registrati effetti collaterali sistemici significativi; possono presentarsi effetti secondari alla modalità di somministrazione (intratecale) quali cefalea, dolore lombare ed infezione nel sito di iniezione.

La procedura, può, tuttavia, risultare difficoltosa, in tutti quei pazienti con grave scoliosi, o altri problemi vertebrali, per cui può essere necessario il ricorso a procedure eco-guidate, TC guidate, videofluoroangiografie [9].

2.1.2 Risdiplam

Risdiplam è una piccola molecola in grado di modulare lo splicing del pre-mRNA del gene SMN2. Tale molecola è concepita per garantire un aumento prolungato dei livelli della proteina SMN a livello centrale e periferico. L'innovativa somministrazione per via orale di Risdiplam è possibile perché la molecola è in grado di superare la barriera emato-encefalica (Fig. 9)

Il farmaco è stato approvato dall'Agenzia Europea dei Medicinali (European Medicines Agency - EMA) a marzo 2021 e da AIFA a giugno 2021 e può essere somministrato a tutti i pazienti con diagnosi di atrofia muscolare spinale con età ≥ 2 mesi.

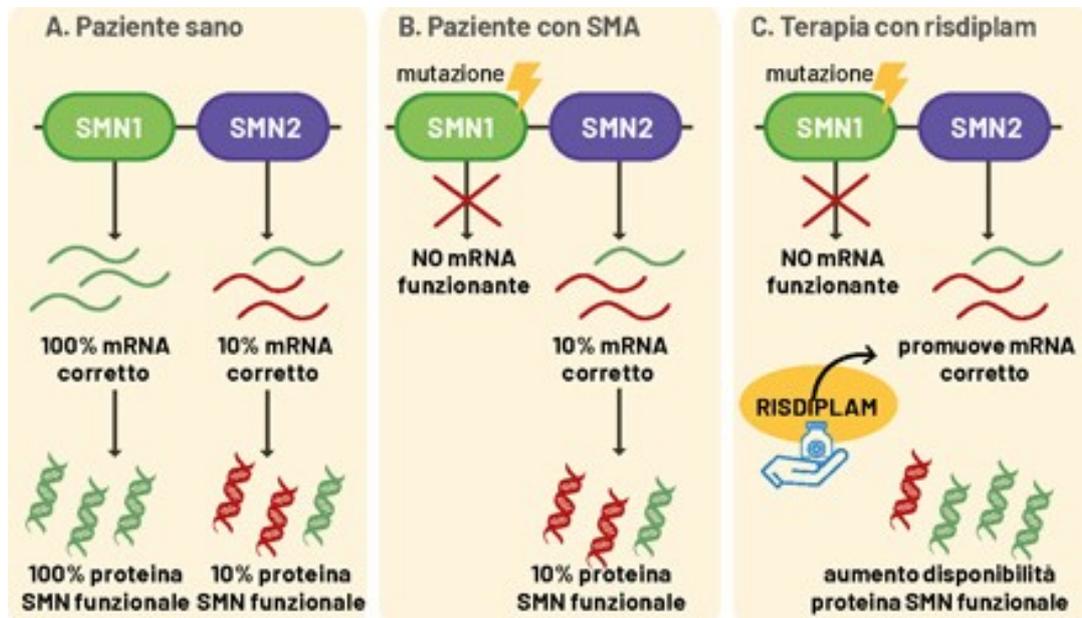


Figura 9: meccanismo d'azione di Risdiplam

Il trattamento prevede un'assunzione giornaliera di una soluzione orale la cui dose viene determinata in base all'età e al peso corporeo del paziente:

- da 2 mesi a < 2 anni: 0,20 mg/kg
- da ≥ 2 anni (< 20 kg): 0,25 mg/kg
- da ≥ 2 anni (≥ 20 kg): 5 mg

La sua sicurezza e l'efficacia sono state studiate in diversi trial clinici. Risdiplam si è dimostrata una molecola sicura ed efficace, in grado di aumentare i livelli circolanti della proteina SMN [11-12]. I risultati ottenuti nella popolazione SMA tipo 1 verranno analizzati nel dettaglio nei capitoli successivi; è stato visto che il suo utilizzo porta ad un miglioramento della funzione motoria e della sopravvivenza in assenza di supporto respiratorio sia nelle forme ad insorgenza precoce che nelle forme di SMA con fenotipo più lieve.

2.2 Terapia genica

2.2.1 Zolgensma

Zolgensma (onasemnogene abeparvovec) veicola all'interno delle cellule una copia perfettamente funzionante del gene SMN1 utilizzando come vettore un virus non replicante adeno-associato, sierotipo 9 (scAAV) in grado di passare la barriera ematoencefalica. La sua somministrazione prevede un'unica infusione endovenosa a seguito della quale si assiste ad un incremento dell'espressione della proteina SMN.

Nel maggio 2019 La Food and Drug Administration ha approvato zolgensma come terapia per i pazienti SMA di età inferiore ai due anni o di peso inferiore ai 21 Kg; in Italia ha ottenuto il consenso da parte di AIFA nel marzo 2021, ricevendo anche l'approvazione per la piena rimborsabilità da parte del Sistema Sanitario Nazionale. La terapia genica, attualmente, può essere somministrata a pazienti con atrofia muscolare spinale di tipo 1 (SMA1), diagnosticati clinicamente con un peso massimo di 13,5 kg e/o pazienti pre-sintomatici aventi fino a 2 copie del gene SMN2. Non possono ricevere terapia: pazienti con peso corporeo superiore ai 13,5Kg e/o pazienti diagnosticati clinicamente (sintomatici) con SMA di tipo 2 o 3 e/o pazienti pre-sintomatici identificati tramite screening neonatale con 3 copie del gene SMN2

La terapia genica è stata studiata per la prima volta nello studio clinico di fase 1, AveXis, nel quale sono stati trattati 15 pazienti pediatrici, di età compresa tra 1 e 8 mesi, con diagnosi di SMA di tipo 1, e due copie di SMN2 [13]. 12 pazienti hanno ricevuto il farmaco "ad alto dosaggio (2×10^{14} vg/kg)" e 3 hanno ricevuto un dosaggio inferiore (6.7×10^{13} vg/kg).

Il tasso di sopravvivenza registrato a distanza di 20 mesi è stato del 100% senza necessità di ricorrere a ventilazione meccanica permanente (> 16 ore al giorno per almeno 14 giorni consecutivi).

Tutti i pazienti che hanno ricevuto la terapia genica hanno migliorato gli *outcome* motori; l'efficacia è stata dimostrata essere dose dipendente: tra i 12 pazienti che ricevevano la dose più alta, 11 pazienti erano in grado di mantenere la posizione seduta senza supporto per almeno cinque secondi, 11 hanno raggiunto il controllo del capo [13]

Gli effetti collaterali più frequentemente registrati sono stati una trombocitopenia asintomatica e/o un incremento delle transaminasi epatiche (fino a 35 volte i limiti superiori della norma per l'alanina aminotransferasi); tale aumento è da attribuire ad una risposta delle cellule T indotta dagli epatociti contro i peptidi derivati dal capsido virale [14]. Per tale motivo, alla popolazione trattata con zolgesma, viene avviata terapia immunosoppressiva mediante glucocorticoidi al dosaggio di 1mg/kg/die dal giorno prima dell'infusione. La terapia steroidea è stata mantenuta per 30 giorni successivi alla terapia genica e successivamente ridotta progressivamente.

3. Screening neonatale

Lo scenario dell'atrofia muscolare spinale (SMA) è stato rivoluzionato negli ultimi anni grazie alla disponibilità delle terapie precedentemente descritte. I diversi trial clinici hanno dimostrato che tanto più precocemente viene iniziato il trattamento migliori sono i risultati clinici ottenuti; l'avvio della terapia in fase pre-sintomatica può verosimilmente determinare il fisiologico raggiungimento delle tappe di sviluppo psicomotorio [15].

L'elevata omogeneità genetica, unita agli ottimi risultati della popolazione trattata in epoca pre-sintomatica, rende la SMA una dei miglior candidati allo screening genetico neonatale (SMA-NBS). L'inserimento della SMA nei programmi nazionali di NBS è un nuovo problema che la comunità scientifica deve affrontare. Va notato che lo screening neonatale identifica solo le delezioni dell'esone 7, ma non le mutazioni puntiformi, circa il 5% dei casi potrebbe, quindi, non essere individuato alla nascita [16].

Nel 2019, in Italia, è stato avviato un progetto pilota nelle regioni Lazio e Toscana. Sfruttando la rete già creata per lo screening neonatale delle patologie metaboliche sono stati raccolti oltre 30000 campioni di sangue a 48/72 ore di vita. I campioni venivano mandati al centro di riferimento regionale, il test veniva eseguito entro 0-3 giorni dal suo arrivo. Sono stati identificati un totale di sei neonati positivi allo screening, per ciascuno di essi è stato eseguito un secondo test di screening e contemporaneamente un prelievo di sangue venoso per eseguire test genetico per la ricerca diretta della mutazione del gene SMN1 e la determinazione del numero di copie del gene SMN2 [15].

Una volta confermata la diagnosi le famiglie sono state prese in carico da un team multidisciplinare, i pazienti con due o tre copie di SMN2 sono stati trattati immediatamente; i pazienti con $SMN2 \geq 4$ sono stati inseriti in un rigoroso follow-up clinico per individuare i primi segni della malattia [15] (Fig.10).

Al momento lo screening neonatale in Italia è attivo in 19 regioni italiane. Il nostro Istituto, in collaborazione con la regione Liguria, ha avviato il programma pilota di Screening Neonatale per la diagnosi tempestiva e simultanea di SMA (atrofia muscolare spinale) e SCID (immunodeficienze combinate gravi) il 4 settembre 2021, permettendo, fino ad oggi, l' identificazione di due bambini trattati entro il primo mese di vita.



Figura 10: illustrazione schematica sui vari step in cui si svolge lo screening

RISULTATI OTTENUTI

4. Pazienti SMA 1 trattati con Nusinersen: 4 anni follow-up

L'arrivo delle nuove terapie ha prodotto un significativo cambiamento nella storia naturale dell'atrofia muscolare spinale (SMA). L'utilizzo delle nuove molecole: nusinersen, risdiplam e onasemnogene abeparvovec (OA) nella SMA di tipo 1 ha portato un netto miglioramento della sopravvivenza e delle abilità motorie in questi pazienti [9-16].

Una delle maggiori preoccupazioni dei clinici esperti è se il miglioramento ottenuto durante le sperimentazioni cliniche venga mantenuto nel tempo. In collaborazione con il gruppo di ricerca italiano ITASMAC, coordinato dal prof Mercuri del policlinico Gemelli, abbiamo raccolto i dati di pazienti affetti da atrofia muscolare spinale tipo 1 a distanza di 4 anni dall'avvio della terapia con nusinersen [17].

4.1 Materiali e metodi

I pazienti sono stati reclutati a partire da novembre 2016, lo studio è stato approvato dal comitato etico regionale di ogni centro partecipante. Tutti i partecipanti o i loro caregiver/tutori legali hanno firmato un consenso informato prima dell'arruolamento. Per tutti i bambini sono state eseguite valutazioni cliniche e scale motorie a distanza di 12, 24, 48 mesi dall'avvio della terapia con nusinersen. Sono state utilizzate le seguenti scale motorie:

- CHOP INTEND sviluppata specificamente per valutare i neonati affetti da SMA [18]. La scala comprende 16 item con un punteggio totale tra 0 e 64.
- L'HINE-2 una scala neurologica estrapolata dalla scala più generale HINE [19]. Essa fornisce informazioni sullo sviluppo psicomotorio nei bambini di età compresa tra i 2 e i 24 mesi. La scala comprende otto capacità motorie.
- L'HFMSE è una scala di 33 item che valuta le abilità motorie [20]. Il punteggio della scala va da un valore minimo di 0 a un massimo di 66 punti, i punteggi alti indicano una migliore funzione motoria. Poiché l'HFMSE è stata sviluppata specificamente per valutare i pazienti SMA di tipo II e III che hanno raggiunto la

posizione seduta, in questo studio la scala è stata utilizzata solo nei pazienti che hanno raggiunto questo item motorio.

- 6 minutes walking test (6MWT) una valutazione valida e affidabile della capacità di camminare autonomamente in pazienti SMA [21]. Durante il test l'operatore registra la distanza massima percorribile in 6 minuti, su un percorso lineare di 25 metri. Nel presente studio la scala è stata utilizzata solo nei pazienti che erano in grado di camminare autonomamente.

Sono stati studiati un totale di 48 neonati/lattanti affetti da atrofia muscolare spinale tipo 1. I bambini sono stati suddivisi in base alla gravità della patologia utilizzando la classificazione Dubowitz [22], ovvero SMA 1,1 (pazienti più gravi) con esordio entro il primo mese di vita, SMA 1,5 (fenotipo intermedio) e SMA 1,9 (fenotipi più lievi) i cui sintomi compaiono entro i primi sei mesi di vita, con abilità di sostenere il capo in modo autonomo.

Le variabili analizzate sono state: il numero di copie di SMN2, il numero di ore dell'utilizzo del supporto respiratorio e la necessità di sostegno nutrizionale.

Per tutte le analisi statistiche sono stati utilizzati i software SPSS versione 28 (SPSS, Inc.), SAS 9.4 e R versione 1.4.1717., con significatività fissata a $p < 0,05$.

Il valore medio e l'intervallo di confidenza al 95% (CI)/deviazione standard sono stati riportati come valori descrittivi per i diversi sottogruppi. Il confronto delle misure tra i valori ottenuti dalla valutazione basale e quelli ottenuti a 48 mesi sono stati effettuati utilizzando le stime e gli IC al 95% delle differenze pre-post e il test di Wilcoxon. L'analisi della varianza (ANOVA) e il test di Kruskal-Wallis sono stati condotti per confrontare i cambiamenti a 48 mesi del punteggio medio ottenuto alla CHOP INTEND e alla HINE-2 a 48 mesi.

4.2 Risultati

Sono state eseguite un totale di 432 valutazioni cliniche e motorie per 48 bambini affetti da SMA 1 arruolati nello studio. Al basale l'età della popolazione arruolata oscilla tra 7 giorni e 12 anni (media 3,3 anni, SD 3,6 anni). I dettagli delle caratteristiche basali della popolazione sono riportati nella Tabella 3.

Characteristic	Baseline (N=48)
AGE	
Mean (SD)	3.3 (3.6)
[Min, Max]	[0.019, 12]
SMN COPY NUMBER	
1	1 (2.1%)
2	33 (68.7%)
3	14 (29.2%)
DISEASE SEVERITY	
1.1	5(10.6%)
1.5	19 (39.6%)
1.9	24(50.0%)
AGE AT NUSINERSEN TREATMENT	
< 210 days	7(14.6%)
< 2 years	18 (37.5%)
2-4 years	11 (22.9%)
5-11 years	11(22.9%)
≥12 years	1 (2.1%)
RESPIRATORY SUPPORT	
Spontaneous breathing	14 (29.1%)
<10h/daily	18(37.5%)
11-16h/daily	2(4.2%)
>16h/daily	1 (25%)
Tracheostomy	13 (27.1%)
NUTRITIONAL SUPPORT	
Oral feeding	25 (52.1%)
Nasogastric tube	5 (10.4%)
Gastrostomy tube	18(37.5%)
CHOP INTEND	
Mean (SD)	21.0(15.0)
Median	23.0
[min, max]	(0.54)
HINE II TOTAL SCORE	
Mean (SD)	1.3 (2.0)
Median	0.5
[min, max]	(0.8)

Tabella 3: Caratteristiche della popolazione analizzata CHOP INTEND: Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders; HINE Hammersmith Infant Neurological Examination; SD: standrad deviation

I cambiamenti dei punteggi CHOP INTEND tra T0 e dopo 48 mesi oscillano tra -5 e 40 (media: 10,6, SD: 12,1). Quattro pazienti (8,3%) hanno mostrato variazioni negative tra -2 e -5 e quindi un peggioramento clinico. Altri 7 (14,6%) sono rimasti stabili. Dei restanti 37 (77,1%), 3 sono migliorati di 2-3 punti e 33 pazienti hanno riportato un miglioramento di 4 o più punti.

Le variazioni dei punteggi HINE 2, registrati a distanza di 48 mesi dall'avvio della terapia sono compresi tra -2 e 20 (media: 4,3, SD: 5,7). Due pazienti (4,2%) hanno mostrato variazioni negative tra -2 e -1. Altri 24 (50%) sono rimasti stabili o hanno avuto un miglioramento di 1 punto. Dei restanti 22 (45,8%), 3 hanno avuto un miglioramento di 2-3 punti e 19 hanno avuto un miglioramento di 4 o più punti.

La differenza dei punteggi al basale e a 48 mesi è risultata statisticamente significativa ($p < 0,001$) sia utilizzando la scala CHOP-INTEND sia la scala motoria HINE 2.

Al basale non è stato possibile eseguire la HFMSE, poiché nessuno dei pazienti arruolati era in grado di sedersi in modo autonomo. Successivamente 15 pazienti sono stati in grado di eseguire gli ITEM motori proposti dalla scala, al 24° mese l'avvio della terapia (punteggio medio HFMSE: 14,7, SD 8,6) e al 36° mese (media punteggio HFMSE: 17,8, SD 10,6).

Non è stato possibile eseguire il 6MWT al basale, in quanto nessuno dei bambini era in grado di camminare autonomamente. Un solo paziente ha iniziato la deambulazione autonoma a 36 mesi, il 6MWT ha mostrato una distanza percorsa di 90 m a 36 mesi, 143 m a 40 mesi e 165 m a 48 mesi dall'avvio delle infusioni intratecali (Fig. 11).

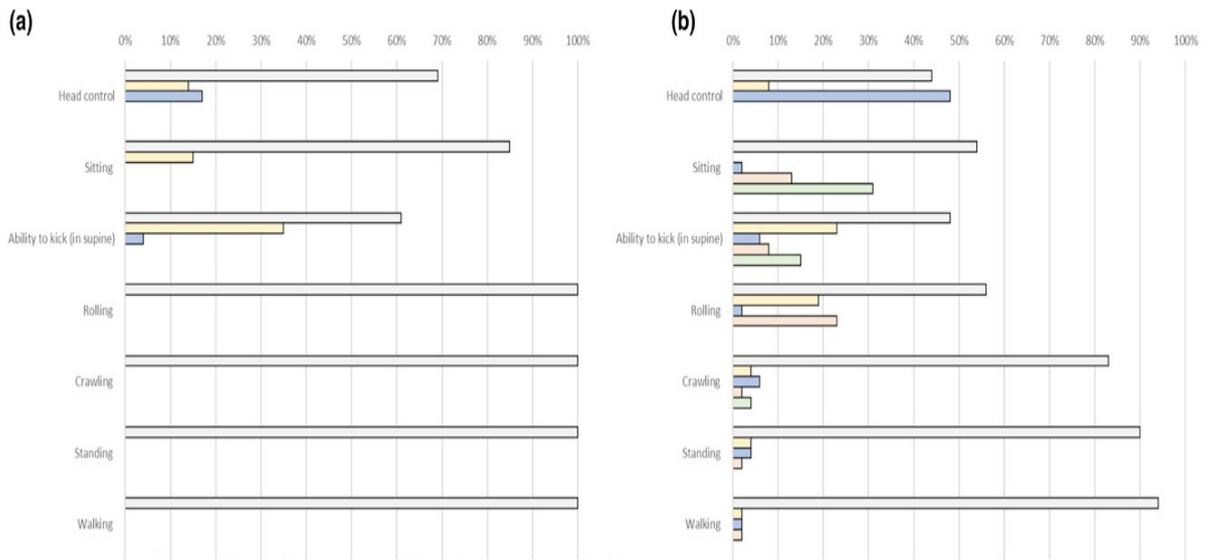


Fig.11: Percentuale dei pazienti suddivisi per item motorio al T0 (a) e al T48 (b) grigio = punteggio 0, giallo = punteggio 1, blu = punteggio 2, arancione = punteggio 3, verde = punteggio 4

Suddividendo i pazienti in base al fenotipo clinico è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa ($p \leq 0.001$) sia nei punteggi CHOP INTEND che nei punteggi ottenuti mediante scala HINE-II. Non è stata registrata una differenza statisticamente significativa tra i punteggi CHOP INTEND e HINE-II ottenuti al basale e 48 mesi nella popolazione SMA 1,1 ($p = 0,144$, $p = 0,655$). Per i SMA 1,5 e SMA 1,9 è stata registrata una differenza significativa tra i due punteggi (rispettivamente $p < 0,001$, $p = 0,008$)

La Figura 12 mostra le traiettorie della popolazione nella CHOP INTEND (a) e HINE-II (b) suddivise sulla base della gravità della patologia.

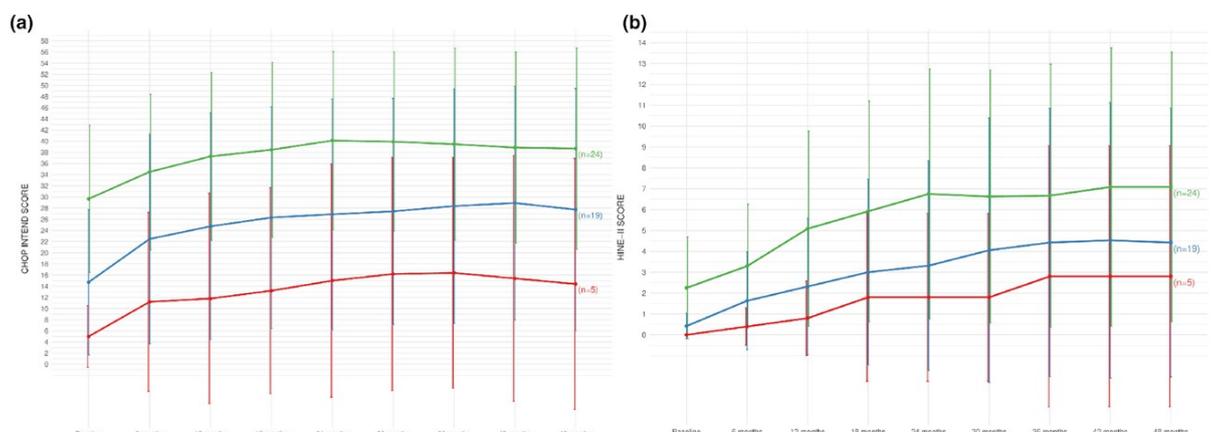


Figura 12: Traiettorie dei punteggi CHOP INTEND (a) e HINE II (b) della popolazione stratificata per gravità di patologia: Legenda della figura: rosso = SMA 1,1, blu = SMA 1,5, verde = SMA 1,9

Successivamente abbiamo suddiviso la popolazione analizzata in base al numero di copie del gene SMN2 (2 copie SMN2, 3 copie SMN2). Il punteggio ottenuto alla CHOP INTEND al basale risulta significativamente più alto nei pazienti con più copie del gene di backup ($p = 0,012$); tale differenza significativa non è stata registrata utilizzando la scala di valutazione HINE II ($p = 0,111$).

Analizzando la differenza tra i punteggi CHOP INTEND e HINE II al T0 e al T48 è stata registrata una differenza statisticamente significativa sia nei pazienti con 2 copie ($p < 0,001$, $p < 0,001$) sia nei pazienti con 3 copie del gene SMN2 ($p < 0,001$, $p = 0.005$).

La Figura 13 mostra i punteggi della popolazione nelle scale CHOP INTEND (a) e su HINE-II (b) suddivise in base al numero di copie SMN2

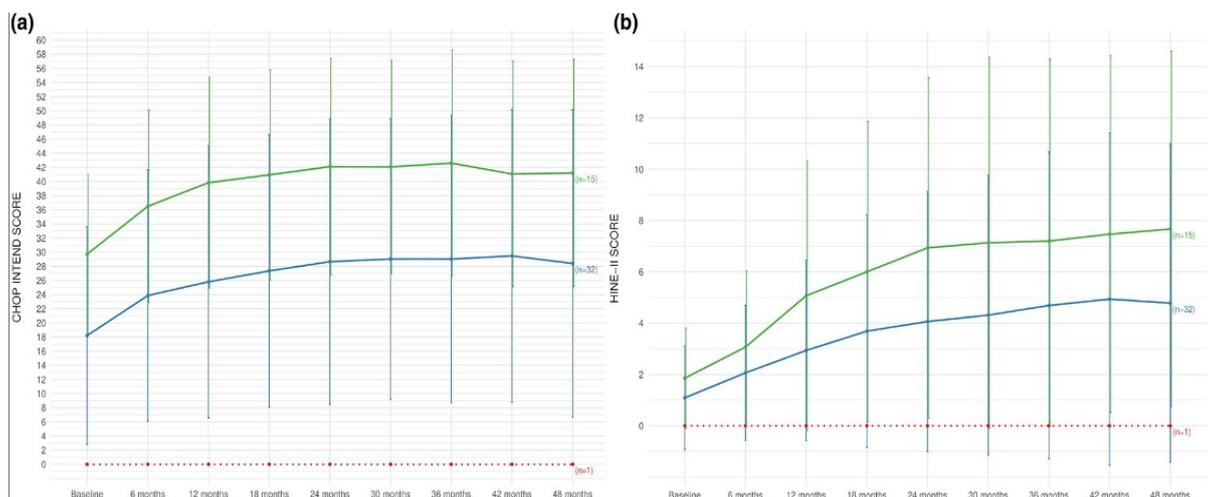


Figura 13: Traiettorie dei punteggi CHOP INTEND (a) e HINE II (b) della popolazione stratificata per numero di copie del gene SMN2: Legenda: rosso = 1SMN2, blu = 2SMN2, verde = 3SMN2.

Successivamente è stata utilizzata, come variabile, l'età all'avvio della terapia con nusinersen: la popolazione è stata suddivisa in quattro sottogruppi:

I gruppo: <210 giorni, II gruppo: <2 anni, III gruppo: 2-5 anni, IV gruppo: 5-12 anni.

I punteggi CHOP INTEND e HINE-II registrati al basale e dopo 48 mesi sono risultati significativamente aumentati nel primo gruppo ($p = 0,017$, $p = 0,018$) e nel II gruppo ($p < 0,001$, $p = 0,001$). Per i bambini di età compresa tra 2 e 5 anni solo nella valutazione CHOP INTEND ($p = 0,010$) è stata registrata una differenza statisticamente significativa tra il T0 e T48. Per i pazienti di età compresa tra i 5 e i

12 anni non è stata registrata alcuna differenza tra i due punteggi in entrambe le scale di valutazione motoria ($p = 0,153$, $p = 0,655$).

La Figura 14 mostra le traiettorie dei punteggi CHOP INTEND (a) HINE-II (b) suddivise per età al momento della classificazione del trattamento. Le variazioni individuali sono mostrate nella Figura 14 (c), (d).

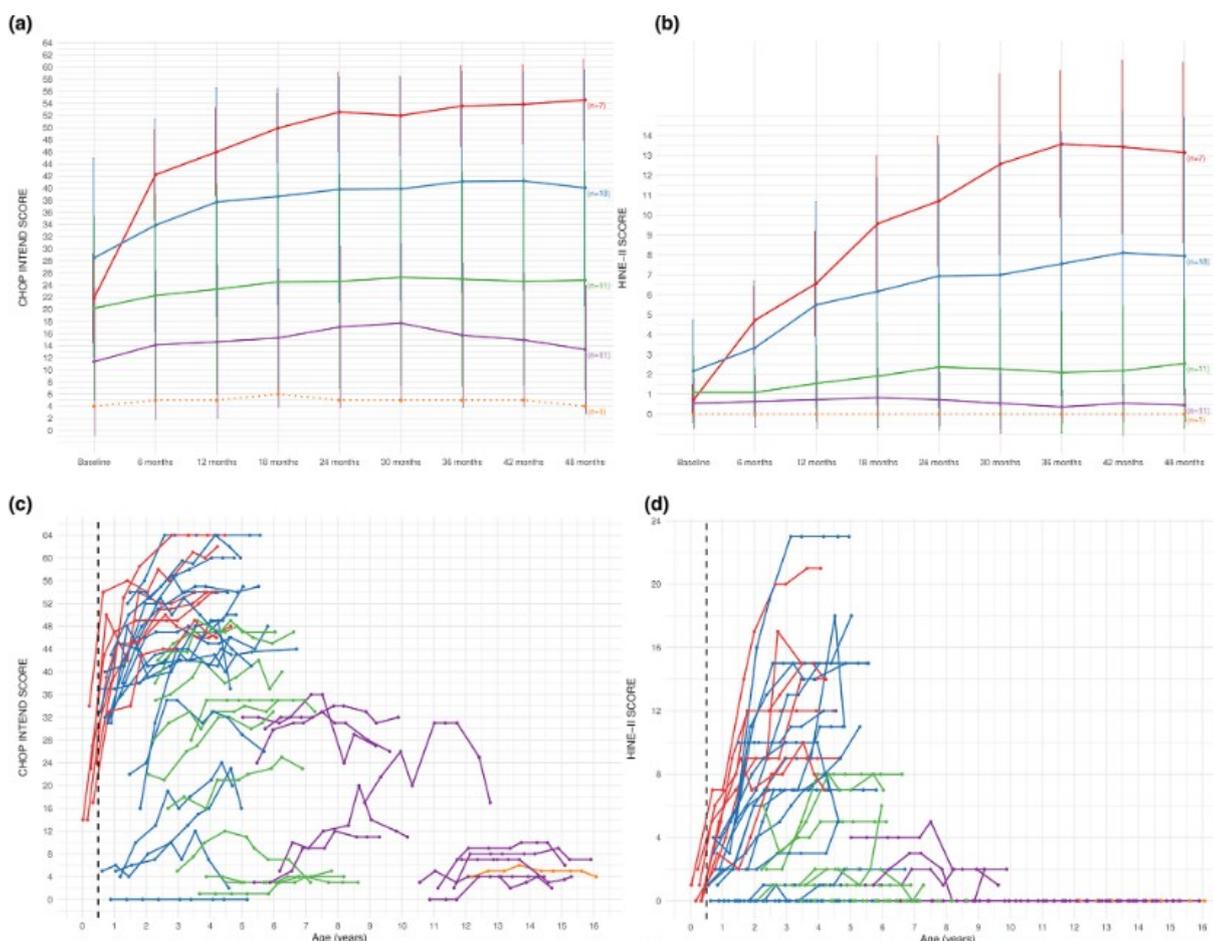


Figura 14: Traiettorie dei punteggi CHOP INTEND (a) e HINE II (b) della popolazione stratificata per età al momento del trattamento; (c) variazioni individuali dei punteggi alla CHP INTEND, (d) variazioni individuali dei punteggi alla HINE II. Legenda delle figure: rosso = <210 giorni, blu = <2 anni, verde = 2-5 anni, viola = 5-12 anni, arancione = > 12 anni.

Analizzando l'aspetto nutrizionale, al T0, 18/48 neonati erano portatori di gastrostomia o sondino nasogastrico, 2 pazienti si alimentavano autonomamente per via orale ma con iniziali segni e sintomi di disfagia, mentre i restanti 23 avevano una nutrizione esclusivamente orale (Tab. 3).

A 48 mesi, dei 23 bambini con funzionalità deglutitoria conservata, 20 sono rimasti stabili, 3 hanno mostrato un peggioramento richiedendo il posizionamento di una gastrostomia. Dei 18 pazienti che avevano gastrostomia o sondino nasogastrico alla valutazione basale, 2 hanno riacquisito parzialmente la capacità ad alimentarsi per via orale.

Per quanto riguarda l'aspetto respiratorio, alla valutazione basale, 13/48 pazienti avevano una tracheostomia, 2 utilizzavano una ventilazione non invasiva (NIV) per un periodo >10 ore giornaliere e un solo paziente era ventilato per un periodo superiore alle 16 ore al giorno, 18 pazienti utilizzavano la NIV per meno di 10 ore e 14 erano in totale autonomia respiratoria con scambi gassosi conservati. Di questi ultimi 14 bambini, 4 avevano già indicazione all'avvio del supporto ventilatorio.

I 10 pazienti in respiro spontaneo, alla rivalutazione eseguita a 48 mesi di distanza, hanno mostrato stabilità del quadro clinico, non richiedendo l'avvio di un supporto ventilatorio. Dei 10 che avevano avviato la NIV per meno di 10 ore al giorno, 2 pazienti hanno mostrato un aumento nel fabbisogno del numero di ore mentre un paziente ha potuto interrompere il trattamento.

Dei 2 pazienti che al basale utilizzavano la ventilazione non invasiva per più di 10 h al giorno, 1 è rimasto stabile e 1 ha avuto bisogno di posizionare la tracheostomia, 2 di essi sono stati in grado di ridurre le ore di ventilazione, rendendosi autonomi per 3/4 ore al giorno (Tab. 3).

4.3 Discussione

Da questo studio di follow up condotto su pazienti SMA1 trattati con nusinersen per quattro anni consecutivi emerge come i progressi motori, ottenuti grazie all'avvio della terapia intratecale, vengono mantenuti nel tempo. Le tappe di sviluppo psicomotorio più frequentemente raggiunte sono state: il controllo completo del capo, la capacità di mantenere la posizione seduta, il rotolamento e i movimenti antigravitari a carico degli arti inferiori.

I cambiamenti nella scala HINE II registrati tra il basale e ai 48 mesi sono stati statisticamente significativi per i sottogruppi SMA 1.5 e 1.9 ma non per SMA 1.1. Questi risultati confermano che, nei casi di tipo I gravemente colpiti, il trattamento ha un effetto marcato sulla sopravvivenza, ma gli effetti sulla funzione motoria sono meno evidenti e limitati [23, 24].

Come già osservato nel follow-up a 2 anni, i cambiamenti più evidenti sono stati osservati nei bambini trattati precocemente (sia utilizzando la scala CHOP INTEND che la scala HINE-II) con un significativo aumento dei punteggi tra il punteggio basale e quello ottenuto a 48 mesi.

Dal punto di vista respiratorio è stato registrato un solo decesso su 48 pazienti; nessun dei pazienti che, al momento dell'avvio della terapia con nusinersen, era in respiro spontaneo ha richiesto supporto ventilatorio, sia esso invasivo che mediante NIV.

Un modello simile di stabilità è stato osservato anche per la funzione deglutitoria. Questi risultati sono leggermente diversi da quelli di un recente studio longitudinale che riporta un aumento della necessità di supporto ventilatorio dal 29,5% (T0), al 59,7% registrato al 38° mese fino ad arrivare al 70% circa al 48° mese dall'avvio del trattamento [25]. La differenza di questi risultati, può essere spiegata, almeno in parte, dal diverso approccio clinico/terapeutico utilizzato nei nostri centri. Si ribadisce, infatti, che oltre al precoce avvio della terapia specifica con Nusinersen, fondamentale è la presa in carico multidisciplinare del paziente. Questo approccio clinico fornisce un valido supporto ed aumenta la possibilità di mantenere e non perdere le funzioni motorie acquisite grazie alla terapia specifica.

Dai dati analizzati i predittori responsabili delle variazioni dei punteggi motori sono stati (i) l'età al momento dell'avvio del trattamento, (ii) lo stato nutrizionale, (iii) l'autonomia respiratoria e (iv) il punteggio di partenza registrato al basale. Questi risultati confermano che l'età dell'avvio del trattamento, da sola, non è l'unico fattore determinante l'evoluzione clinica della patologia, ma deve essere interpretato in relazione allo stato funzionale complessivo (motorio/respiratorio/nutrizionale).

I neonati molto piccoli con segni gravi e precoci di malattia possono presentare un esito non favorevole anche se trattati molto precocemente; contrariamente, i neonati con la forma di SMA 1,9 con esordio più tardivo e segni più lievi possono avere un

esito migliore anche se trattati più tardi, soprattutto se, al momento del trattamento, non presentano segni di coinvolgimento respiratorio o disfunzione bulbare.

I dati analizzati in questo studio includono un'ampia coorte di pazienti senza i criteri di esclusione restrittivi presenti nei trial clinici iniziali. Inoltre, dai dati analizzati, Nusinersen si è dimostrato, un farmaco sicuro: nessun evento avverso grave è stato registrato tra la popolazione analizzata; solo il 20% dei pazienti ha riferito sintomi legati alla procedura di rachicentesi quali cefalea o rachialgia, che non hanno mai richiesto un ricovero.

In conclusione, i nostri risultati sottolineano l'efficacia di nusinersen, ed evidenziano come i miglioramenti motori ottenuti grazie all'avvio di questa terapia vengano mantenuti nel tempo. Bisogna, tuttavia, ribadire l'importanza del supporto multidisciplinare di cui questi pazienti hanno bisogno e senza il quale non si potrebbero ottenere risultati così entusiasmanti.

5. Pazienti SMA1 trattati con Risdiplam a confronto con la storia naturale.

Risdiplam, come detto nei capitoli precedenti, è una piccola molecola che agisce modulando lo splicing del pre-mRNA del gene SMN2 determinando la produzione di una proteina funzionale. Per la sua capacità di passare la barriera emato-encefalica Risdiplam può essere somministrato per via orale o enterale.

Attraverso il trial clinico sperimentale Firefish è stata valutata la sicurezza e l'efficacia di risdiplam in neonati affetti da atrofia muscolare spinale tipo 1, di età compresa tra 1 e 7 mesi, in particolare è stata valutata la loro capacità di raggiungere la posizione seduta in modo autonomo, item impossibile da raggiungere per i neonati con atrofia muscolare spinale tipo 1 in assenza di una specifica terapia [26].

Lo studio è stato approvato dal comitato etico di ciascun centro partecipante ed è stato condotto in conformità con i principi della Dichiarazione di Helsinki e delle linee guida di buona pratica clinica. I genitori dei pazienti arruolati hanno firmato un consenso informato per la partecipazione allo studio.

Lo sponsor F. Hoffmann-La Roche, ha fornito il farmaco per lo studio ed è stato il responsabile del monitoraggio clinico, della gestione della sicurezza e dell'analisi dei dati statistici.

Durante lo studio, iniziato nel 2018 e terminato a dicembre 2023, sono stati arruolati 41 neonati seguiti in 14 centri di 10 Paesi (Tab. 4.)

I criteri di eleggibilità includevano (i) una diagnosi genetica di SMA 5q, (ii) una diagnosi clinica di SMA di tipo 1 (basata su un'insorgenza di sintomi tra i 28 giorni e i 3 mesi di vita), (iii) due copie del gene SMN2 e (iv) un'età compresa tra 1 e 7 mesi al momento dell'arruolamento. Sono stati esclusi dallo studio bambini in ventilazione invasiva o non invasiva per un tempo superiore alle 16 ore al giorno, o pazienti in trattamento con altre terapie specifiche per la SMA (nusinersen o terapia genica).

I bambini arruolati hanno assunto giornalmente risdiplam alla dose di 0,2 mg per chilogrammo di peso corporeo.

Per i pazienti in grado di deglutire, il risdiplam è stato somministrato per via orale; per quelli che non erano in grado di deglutire, è stato somministrato attraverso sondino naso gastrico o gastrostomia.

L'obiettivo primario dello studio è stato valutare la capacità di mantenere la posizione seduta senza supporto per almeno 5 secondi, dopo 12 mesi dall'avvio del trattamento. Lo sviluppo psicomotorio dei pazienti arruolati è stato valutato mediante l'utilizzo di scale motorie standardizzate per patologia (Bayley, HINE2, HFSME) (Tab. 4)

Characteristic	All infants (N=21)
Sex – no. /%	
Female	15 (71)
Male	6(29)
Mediane age (range) –no.	
At onset of symptoms	3.0(0.9-3.0)
At diagnosis	3.0(0.9-5.4)
At enrollment	6.7(3.3-6.9)
Motor measures	
Median CHOP-INTEND score (range)	24(10-34)
Medina HINE-2 score (range)	1(0-3)
Respiratory support – no. (%)	5 (24)

Tabella 4: Caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti SMA 1

Gli end point secondari dello studio sono stati:

1. Ottenere un punteggio alla scala di valutazione CHOP INTEND superiore a 40
2. Ottenere un aumento del punteggio di almeno 4 punti utilizzando alla scala di valutazione CHOP –INTEND
3. Ottenere un aumento di 2 punti sulla scala di valutazione Hammersmith Infant Neurological Examination (HINE-2)
4. Valutare la sopravvivenza libera da eventi, quali necessità di supporto ventilatorio (sia esso invasivo che non invasivo) per un periodo superiore alle 16 ore al giorno (Tab. 5)

End Point	Performance criterion	All infants N=41		P Value
	%	No.	%(95% CI)	
Primary endpoint				
Able to sit without support for ≥ 5 sec	5	12	29 (16-46)	<0.001
Secondary endpoint assessed at 12 mo				
CHOP INTEND ≥ 40	17	23	56(40-72)	<0.001
+ \geq points from T0 in the CHOP INTEND	17	37	90 (77-97)	<0.001
HINE-2 motor milestone responde	12	32	78 (62-89)	<0.001
Event-free survival	42	35	85(70-93)	<0.001

Tabella 5: risultati ottenuti dallo studio

5.1 Materiali e metodi

Per valutare la sicurezza del farmaco ciascun paziente è stato sottoposto a valutazioni cliniche complete e periodiche, esami ematici, ECG, valutazioni oculistiche cadenzate, a causa degli effetti tossici sulla retina riscontrati nelle scimmie [27].

Le analisi statistiche sono state condotte confrontando i pazienti arruolati con studi di storia naturale SMA 1.

Le coorti storiche sono state utilizzate per ricavare le percentuali, definite come “criterio di performance”, con cui sono stati confrontati i pazienti dello studio. Tali coorti sono state scelte in modo da essere il più possibile simili alla popolazione arruolata nello studio (per età e sesso).

5.2 Risultati

Sono stati arruolati un totale di 41 pazienti, l'età mediana all'arruolamento è stata di 5,3 mesi (range da 2,2 a 6,9) e il 54% dei neonati era di sesso femminile. I dettagli della popolazione sono riportati nella Tabella 4.

Il punteggio mediano al tempo basale (ossia prima dell'avvio della terapia con risdiplam) ottenuto alla CHOP-INTEND era di 22,0 (range, da 8,0 a 37,0), il punteggio mediano alla HINE-2 era di 1,0 (range, 0,0-5,0). Al momento dell'arruolamento 39 dei 41 pazienti (95%) erano in grado di alimentarsi esclusivamente per via orale, 29 su 41 pazienti (71%) non avevano bisogno di supporto ventilatorio. Nessun paziente era in grado di mantenere la posizione seduta in modo autonomo.

Dopo 12 mesi di trattamento, 12 su 41 neonati (29%) erano in grado di stare seduti senza supporto (end point primario); la percentuale è significativamente più alta rispetto al 5% descritto negli studi di storia naturale ($P < 0,001$) (Fig. 15; Tab. 5).

Per quanto riguarda gli endpoint secondari, dopo 12 mesi di trattamento, 23 su 41 neonati (56%) hanno raggiunto un punteggio alla scala CHOP-INTEND pari o superiore a 40, rispetto al 17% descritti nella coorte storica analizzata ($P < 0,001$) (Fig. 15; Tab. 5). Tutti i bambini, eccetto uno, hanno aumentato di almeno 4 punti il punteggio CHOP come mostrato in figura 15, 32 su 41 neonati (78%) hanno aumentato il loro punteggio sulla scala di valutazione HINE2 di almeno due punti, rispetto al criterio di performance del 12% ($P < 0,001$) (Tab. 5)

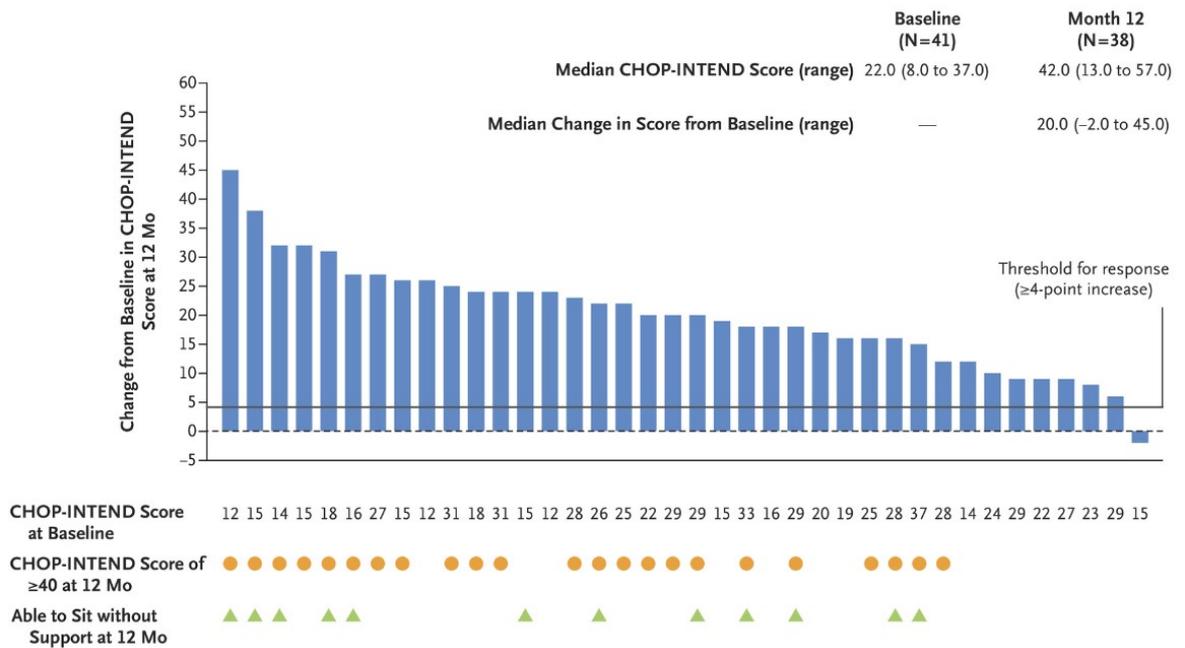


Figura 15 mostra i punteggi basali della CHOP INTEND di 38/41 bambini arruolati, I cerchi arancioni corrispondono ai bambini che hanno ottenuto un punteggio CHOP INTEND >40 al T12, I triangoli verdi corrispondono ai bambini in grado di sedersi autonomamente al T12

La sopravvivenza libera da eventi è stata definita come la sopravvivenza senza l'uso di ventilazione permanente (tracheostomia o ventilazione non invasiva) per più di 16 ore al giorno per un tempo superiore alle 3 settimane, in assenza o dopo la risoluzione di un evento acuto reversibile. Dopo 12 mesi di trattamento con risdiplam, 35 su 41 neonati (85%) hanno avuto *free survival*, ossia non hanno avuto necessità di avviare supporto ventilatorio rispetto al criterio di performance del 12% (P<0,001) degli studi di storia naturale.

Un totale di 254 eventi avversi sono stati registrati nei 14 centri che hanno partecipato allo studio. Quelli più comunemente riportati sono stati infezioni a carico delle vie respiratorie: polmonite (in 13 neonati) e bronchiolite, a causa dell'ipotonìa e dell'insufficienza respiratoria che caratterizza pazienti affetti da SMA tipo 1. Tre neonati hanno avuto complicazioni respiratorie che hanno portato all'exitus (Tab. 6).

I risultati degli esami ematici, i parametri vitali e gli elettrocardiogrammi eseguiti non hanno mostrato alcun elemento patologico. Le valutazioni oftalmologiche non hanno evidenziato danni a carico della retina, diversamente da quanto osservato nelle scimmie trattate con risdiplam [27].

Adverse event	All infant (N=41)
Total no. Of adverse event	254
≥Adverse event – no (%)	41 (100)
Total no. Of serious adverse events	48
≥Serious adverse event – no. (%)	24 (59)
Adverse event with fatal outcome – no. (%)	3 (7)
≥ 1 serious Adverse event leading to dose modification or interruption – no. (%)	1 (2)
≥1 Adverse event leading to dose modification or interruption – no. (%)	2 (5)
≥ Adverse event of grade 3-5- no. (%)	22 (54)
Most common advrese event – no. (%)	
Upper respiraotry tract infection	28 (68)
Pneumonia	16 (39)
Pyrexia	16(39)
Constipation	8 (20)
Diarrhea	4 (10)
Maculopapular rash	1 (10)
Most common serious adverse event – no. (%)	
Pneumonia	13 (32)
Bronchiolite	2(5)
Hypotonia	2(5)
Respiratory failure	2 (%)

Tabella 6: eventi avversi presentati dalla popolazione analizzata. Gli eventi avversi non sono stati correlati al risdiplam ma alle complicazioni SMA-correlate

5.3 Discussione

Dopo 1 anno dall'avvio della terapia con risdiplam il 29% dei bambini SMA 1 arruolati nello studio era in grado di stare seduta senza supporto per almeno 5 secondi (end point primario), un traguardo non raggiungibile in assenza di terapia [26, 28].

Gli end point secondari sono stati raggiunti da più del 50% dei bambini arruolati e differiscono significativamente dai dati della letteratura di storia naturale. Tutti i bambini arruolati, ad eccezione di uno, hanno avuto un aumento di almeno 4 punti dopo 12 mesi di trattamento nella scala CHOP-INTEND, il 56% ha registrato un punteggio uguale o superiore a 40 a differenza di quanto osservato nelle coorti storiche in cui l'andamento era sempre peggiorativo nel tempo [29, 30, 6].

Esistono altre due terapie approvate per la SMA, nusinersen e terapia genica, ma i risultati ricavati dalla loro somministrazione non possono essere confrontati con i quelli ottenuti dalla somministrazione di risdiplam, a causa delle differenti caratteristiche nelle coorti analizzate, la diversa durata del trattamento e i cambiamenti negli standard di cura.

In conclusione è possibile affermare che il trattamento con risdiplam per via orale per un periodo di 12 mesi, in pazienti affetti da SMA tipo 1, ha portato ad una percentuale più alta di bambini che hanno ottenuto un miglioramento motorio, con capacità di mantenere la posizione seduta in modo autonomo per almeno 5 secondi.

6.Terapia genica: predittori di efficacia e sicurezza in pazienti SMA 1 naive precedentemente trattati con altre terapie.

Onasemnogene abeparvovec (OA) permette di veicolare, attraverso vettori virali adeno-associati (AAV9), il gene mancante SMN1 all'interno delle cellule. Recenti studi clinici hanno mostrato un notevole aumento della sopravvivenza e delle funzionalità motorie nei pazienti affetti da atrofia muscolare spinale tipo 1 [13,47,48]. I trial sperimentali hanno arruolato solo neonati o lattanti di età inferiore a 7 mesi e di peso inferiore/ uguale a 8,5 kg, [13-49]; dopo l'approvazione da parte di AIFA il farmaco è stato commercialmente reso disponibile per una gamma più ampia di pazienti; molte famiglie, infatti, i cui figli al momento della diagnosi erano stati trattati con nusinersen, unico farmaco fino ad allora disponibile, hanno chiesto l'opportunità di poter eseguire la terapia genica. La richiesta è stata dettata sia dalla possibilità di evitare iniezioni intratecali ripetute, sia dai risultati entusiasmanti della terapia genica ottenuti nei bambini più piccoli [50]. Recenti studi hanno, tuttavia, evidenziato come i risultati ottenuti dopo terapia genica nei bambini più grandi siano meno evidenti rispetto ai pazienti trattati precocemente [50].

In questo lavoro, condotto insieme al gruppo di ricerca nazionale ISMAC, abbiamo studiato 67 pazienti, di diversa età, trattati con OA, valutando l'efficacia e la sicurezza del farmaco e cercando di stabilire possibili fattori prognostici, prestando particolare attenzione a quei bambini trattati precedentemente con altre terapie.

6.1 Materiali e Metodi

La coorte esaminata include 67 pazienti con diagnosi genetica di atrofia muscolare spinale di tipo 1 (delezione in omozigosi del gene SMN1) trattati con OA tra gennaio 2020 e marzo 2022, con follow-up di almeno 6 mesi. 46 pazienti su 67 hanno raggiunto un follow-up di 12 mesi. I dati sono stati raccolti prospetticamente utilizzando una scheda elettronica nell'ambito delle attività del registro nazionale italiano. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico istituzionale (2355/18 ID:1894) e tutti i genitori hanno firmato un consenso informato.

19 su 67 paziente non avevano ricevuto alcuna terapia prima della somministrazione della terapia genica. 46 su 67 erano stati precedentemente trattati con nusinersen, 2 erano stati trattati con risdiplam.

Tutti i pazienti hanno ricevuto la dose standard di $1,1 \times 10^{14}$ vg/kg di OA per via endovenosa, somministrato in un'ora.

A partire dal giorno precedente l'infusione è stata avviata terapia steroidea orale mediante prednisolone ad una dose standard di 1 mg/kg/die e proseguita per almeno 4 settimane dopo il trattamento.

Il follow up è stato caratterizzato dall'esecuzione di valutazioni cliniche ed di esami bio-umorali il 2° e il 7° giorno dall'infusione e successivamente a cadenza settimanale per ulteriori 4 settimane, seguite da intervalli bisettimanali per 2 mesi, e mensili per altri 3 mesi. Sulla base delle esigenze cliniche di ciascun paziente potevano essere eseguite delle valutazioni aggiuntive.

Tutti i pazienti sono stati valutati utilizzando la CHOP-INTEND (Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders) comprensiva di 16 item con un punteggio totale compreso tra 0 e 64 (un punteggio più alto riflette una maggiore livello di funzione motoria). Le valutazioni sono state eseguite subito prima l'inizio del trattamento (T0), dopo 3 mesi (T3), dopo 6 mesi (T6) e dopo 12 mesi (T12) dall'infusione.

Gli esami ematici, comprensivi di emocromo completo, funzionalità renale ed epatica, creatina-chinasi e livelli di troponina sono stati eseguiti nei giorni +2 e +7 dal termine dell'infusione, successivamente ogni settimana per almeno 4 settimane, seguiti da intervalli bisettimanali per 2 mesi e mensili per altri 2 mesi. In caso di riscontro di alterazioni degli enzimi epatici (in particolare aspartato transferasi (AST) e alanina transaminasi (ALT)) gli esami sono stati ripetuti ogni tre giorni fino alla normalizzazione; contestualmente è stata aumentata la dose di terapia steroidea al dosaggio di 2mg/kg/die. Al T0, per ogni paziente, è stata eseguita una valutazione cardiologica comprensiva di ecocardiografia e ed elettrocardiogramma, ripetuta sulla base dell'andamento clinico e dei livelli sierici di troponina.

La coorte è stata stratificata in base al sesso, al numero di copie del gene SMN2, all'età e al peso ($\leq 8,5$ kg, $> 8,5$ kg) all'inizio del trattamento. La gravità della malattia

è stata definita utilizzando la classificazione Dubowitz [22]: SMA 1,1 (pazienti più gravi), SMA 1,5 (intermedio) e SMA 1,9 (fenotipi più lievi).

Sono state utilizzate semplici statistiche descrittive: la mediana e l'intervallo interquartile (IQR), la media e la deviazione standard (SD).

Per valutare le differenze tra T12 e T0 è stato utilizzato il test di Wilcoxon. Il test di Kruskal-Wallis è stato, invece, utilizzato per studiare le differenze tra i cambiamenti di punteggio nella scala CHOP-INTEND a 12 mesi in base ai sottogruppi di stratificazione.

Per valutare l'effetto delle diverse variabili di stratificazione sull'acquisizione delle tappe di sviluppo psicomotorio sono stati calcolati *l'hazard ratio* e il suo intervallo di confidenza al 95% mediante il modello di regressione di Cox (univariabile e multivariabile).

I livelli sierici di AST e ALT sono stati definiti elevati se superiori a due volte il range di norma [16]. Il test di Kruskal-Wallis/Mann-Whitney è stato utilizzato per valutare l'associazione tra i valori massimi di AST e ALT, l'età, il peso, il sottotipo di SMA, il numero di copie di SMN2 e il sesso.

La regressione binomiale negativa, aggiustata per giorni di follow-up, è stata utilizzata per verificare la connessione tra i valori alterati di transaminasi e variabili quali: il sesso, l'età, la precedente terapia con nusinersen, il peso all'inizio del trattamento.

6.2 Risultati

Al momento dell'infusione di OA, 66/67 (98,5%) pazienti avevano un peso compreso tra 3,2 e 13,5 kg. La loro età era compresa tra 22 giorni e 58 mesi. Un unico bambino, con un peso di 17 kg, è stato trattato off label all'età di 72 mesi.

Quattro dei 67 bambini (5,97%) sono stati identificati mediante screening neonatale e quindi asintomatici al momento del trattamento. (Tab. 7).

	Whole cohort (N=67)	Naive (N=19)	Pre-treated (N=48)	12 month cohort (N=46)
Age (months)				
Mean (SD)	20 (17)	3 (2.49)	26 (17.49)	22 (18.26)
Median (range)	12 (0-72)	3 (0-10)	25 (3-72)	18 (1-72)
Weight (kg)				
Mean (SD)	8.29 (2.69)	5.82 (2.49)	9.23 (2.41)	8.85 (2.65)
Median (range)	8.1 (3.2-17.0)	5.6 (3.2-9.2)	9 (5.4-17.0)	9 (4.1-17.0)
Male	44	11	34	32
female	23	10	13	14
SMA type (N)				
Pre-symptomatic	4	2	2	2
SMA 1	62	16	62	44
SMN Copies (N)				
2	62	17	62	42
3	4	1	4	4
CHOP INTEND patients' distribution per time-points				
T0	67	19	48	46
T3	65	19	46	46
T6	65	19	46	46
T12	46	9	39	46

Tabella 7: Dettagli dell'intera coorte, dei pazienti naïve e di quelli precedentemente trattati.

Quarantasei dei 67 pazienti (68,66%) avevano almeno una valutazione CHOP-INTEND al momento dell'inizio del trattamento (T0) e a 12 mesi (T12) (range 11,5-12,9 mesi).

I punteggi CHOP intend ottenuti durante il periodo di follow up, analizzati mediante test di wilcoxon, sono risultati aumenti in modo statisticamente significativo. Il test di Kruskal-Wallis è stato utilizzato per esaminare le differenze sui cambiamenti dei punteggi CHOP-INTEND a 12 mesi dall'infusione della terapia genica, in base ai sottogruppi di stratificazione.

Tali risultati sono illustrati nel dettaglio nella Tabella 8.

Startification subgroups	Time	Total (N)	Median (IQR)	Mean (SD)	P-value Wilcoxon	Median Change T12-T0 (IQR)	Mean change T12-T0 (SD)	P-value Kruskal-Wallis
Age at OA treatment								
< 6 months	T0	15	30(20)	34.4(14.5)	P=0.001	17(12)	16.7(7,56)	P= 0.0005
	T12	15	51(19)	51.1 (10.8)				
7-24months	T0	12	42.5(5.75)	42.1(8.27)	P=0.003	6(12)	9.75 (8.4)	
	T12	12	52.5(9.5)	51.8(7.07)				
>24 months	T0	19	50(8.5)	47.1 (10.3)	P<0.001	3(6.5)	5.11(5.20)	
	T12	19	53(8)	52.2 (9.15)				
SEX								
Female	T0	14	43.5(22.8)	41.2 (14.5)	P=0.001	8.5(813.8)	10.8(9.23)	P=0.68
	T12	14	53(8.5)	52(7.81)				
Male	T0	32	43.5(13.2)	41.8 (11.7)	P<0.001	8.5(14)	9.78(8.16)	
	T12	32	52(11.5)	51.6(9.69)				
Weight								
<8500gr	T0	20	36.5(20)	36.7(13.4)	P=0.001	17(13.2)	15(8.48)	P<0.001
	T12	20	51.5(14.2)	51.8(9.64)				
>8500gr	T0	26	47(10.8)	45.5(10.4)	P<0.001	4(6.75)	6.27(6.16)	
	T12	26	53.5(10.2)	51.7(8.81)				
SMN copy number								
2	T0	42	42.5(19)	40.4(12)	P<0.001	8.5(14.8)	10.3(8.44)	N/A
	T12	42	52 (13.2)	50.8(8.83)				
3	T0	4	55.5(18)	54.5(11.1)	N/A	6.5(14)	7.5(8.81)	
	T12	4						
SMA I severity disease								
1.1	T0	4	30(13)	29.5(8.19)	N/A	14(9.5)	15.5(6.81)	P=0,04
	T12	4	44.5(11)	45(12)				
1.5	T0	32	43(19)	39.8(11.7)	P<0.001	10.5(15.2)	11.3(8.56)	
	T12	32	52(10.2)	51.1(8.31)				
1.9	T0	8	51(8)	20(8.18)	P=0.035	3(4.5)	4.62(5.78)	
	T12	8	54(14)	54.6(9.02)				
Pre-treatment								
No	T0	7	30(9.5)	30.4(9.03)	P=0.022	17(9.5)	16.6(6.32)	P=0.8617
	T12	7	47(9.5)	47(10.3)				
Yes	T0	8	38.5(25.8)	37.9(18.0)	P=0.022	1935(11.2)	16.58(8.94)	
	T12	8	59(14.0)	54.6(10.6)				

Tabella 8: Risultati di CHOP-INTEND a 12 mesi sul campione di 46 pazienti del test di Wilcoxon e del test di Kruskal-Wallis/Mann-Whitney in base ai sottogruppi di stratificazione.

È stato successivamente utilizzato un modello misto lineare per analizzare gli effetti delle variabili di stratificazione sui punteggi motori della CHOP INTEND a 12 mesi. L'età al momento del trattamento è risultata avere un effetto significativo ($P < 0,001$) sui punteggi CHOP-INTEND a 12 mesi. (Tab. 9).

Parameter	CHOP Estimate (95% CI)	P-value
Intercept	6.27(-0.08,12.6)	0.053
Time		
T0(reference level)		
T3	11.33(8.85,13.81)	<0.001
T6	13.93 (11.45,16.41)	<0.001
T12	16.67(14.19,19.15)	<0.001
Sex		
Female(reference level)		
Male	-1.00(-.389,1.90)	0.500
Age		
<6months(reference level)		
7-24 months	1.32(-3.92,6.57)	0.499
>24months	2.65(-.76,9.07)	0.81
Pre treatment with nusinersen		
No (reference level)		
Yes	1.39(-2.71,5.49)	0.506
Weight at treatment		
<8500gr(reference level)		
>8500g	-0.72(-5.06,3.62)	0.746
Disease severity		
1.1(reference level)		
1.5	-2.88,7.11)	0.408
1.9	0.77(0.64,0.91)	<0.0001
SMN copy		
2(reference level)		
3	2.13(-2.97, 7.23)	0.415
Time Age at treatment		
T3 7-24 month	-5.58 (-9.30, -1.86)	0.003
T6 7-24 month	-6.43(-10.15,-2.17)	<0.0001
T12 7-24 month	-6.92(-10.64,-3.20)	<0.0001
T3 >24 month	-8.70(-12.2-5.38)	<0.0001
T6 >24 month	-10.09(-13.41,-6.77)	<0.0001
T12 >24 month	-11.56(-14.88,-8.24)	<0.0001

Tabella 9: Parametri ricavati utilizzando il punteggio CHOP-INTEND come variabile dipendente. P value significativo <0.05

La Figura 16 mostra i dettagli dei pazienti che hanno raggiunto i punteggi di cut off di 40, 50 e 60 alla scala di valutazione CHOP-INTEND sia della coorte di pazienti “naive” sia nei pazienti precedentemente trattati, al T0 e dopo 12 mesi.

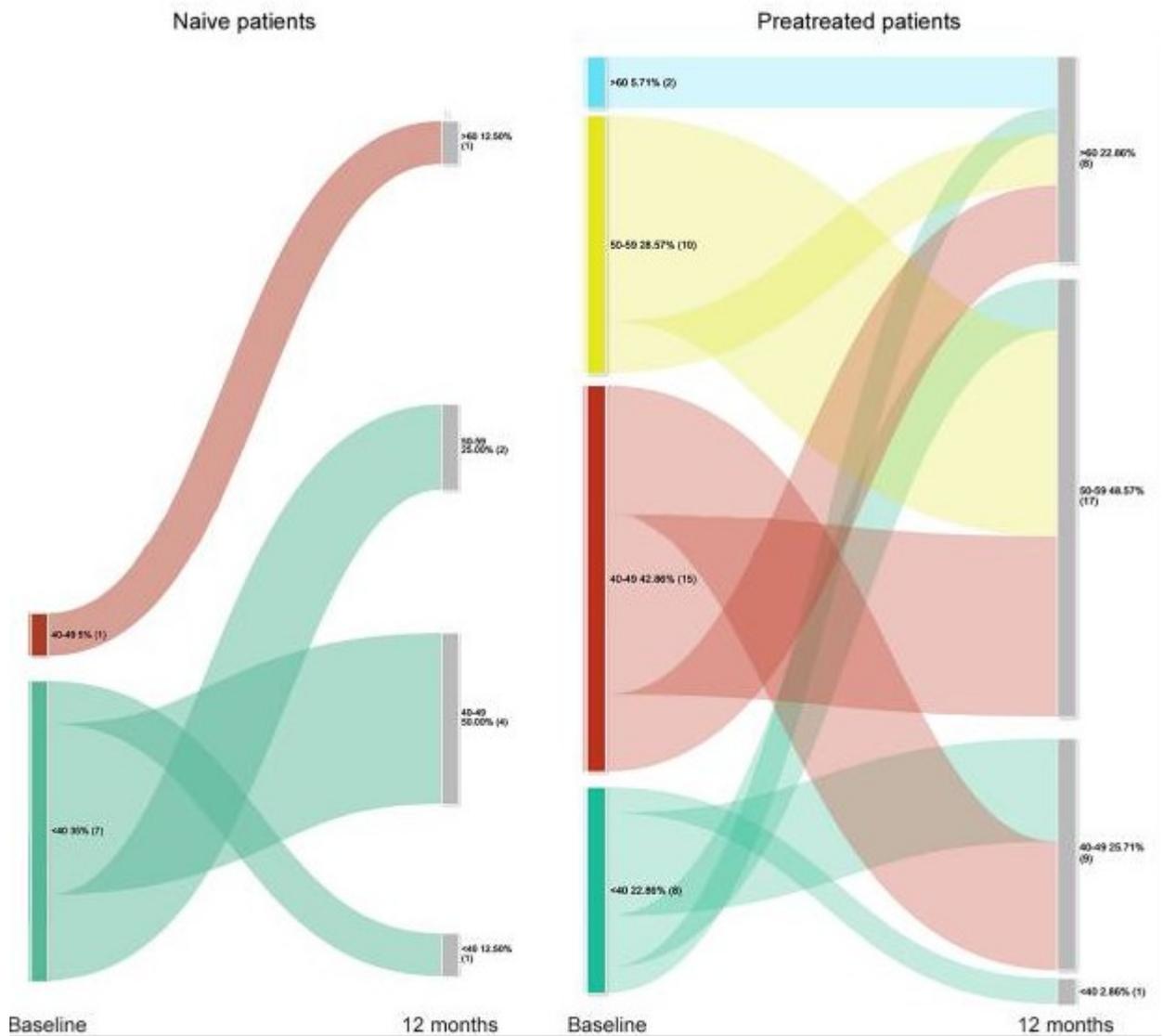


Figura 16: Dettagli sui bambini sintomatici che hanno raggiunto i punti di cut off di 40, 50 e 60 sul CHOP-INTEND nelle coorti naive e precedentemente trattate al basale e dopo 12 mesi.

La posizione seduta è stata raggiunta in tutti e 4 i pazienti identificati mediante screening neonatale (100%, età media 7,75 mesi; età media all'ultimo follow-up 15 mesi). Un paziente è stato in grado di acquisire la stazione eretta a 10 mesi (25%) e due pazienti hanno acquisito anche la capacità di camminare in modo autonomo (50%, rispettivamente a 16 e 17 mesi).

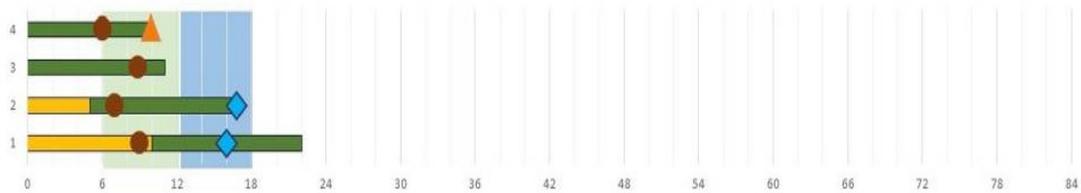
Nei 16 naïve il tasso di sopravvivenza è stato del 100%, la capacità di mettersi seduti autonomamente è stata raggiunta in 6 bambini (37,5%) (età media al momento della seduta: 11 mesi; età media all'ultimo follow-up 13 mesi). Uno (6,25%) ha anche acquisito l'item motorio della posizione eretta a 12 mesi.

Nei 46 pazienti sintomatici pretrattati il tasso di sopravvivenza registrato è stato del 100%; la posizione seduta è stata raggiunta da 38 bambini/46 (83%) (età media di 27 mesi; età media all'ultimo follow-up 37 mesi).

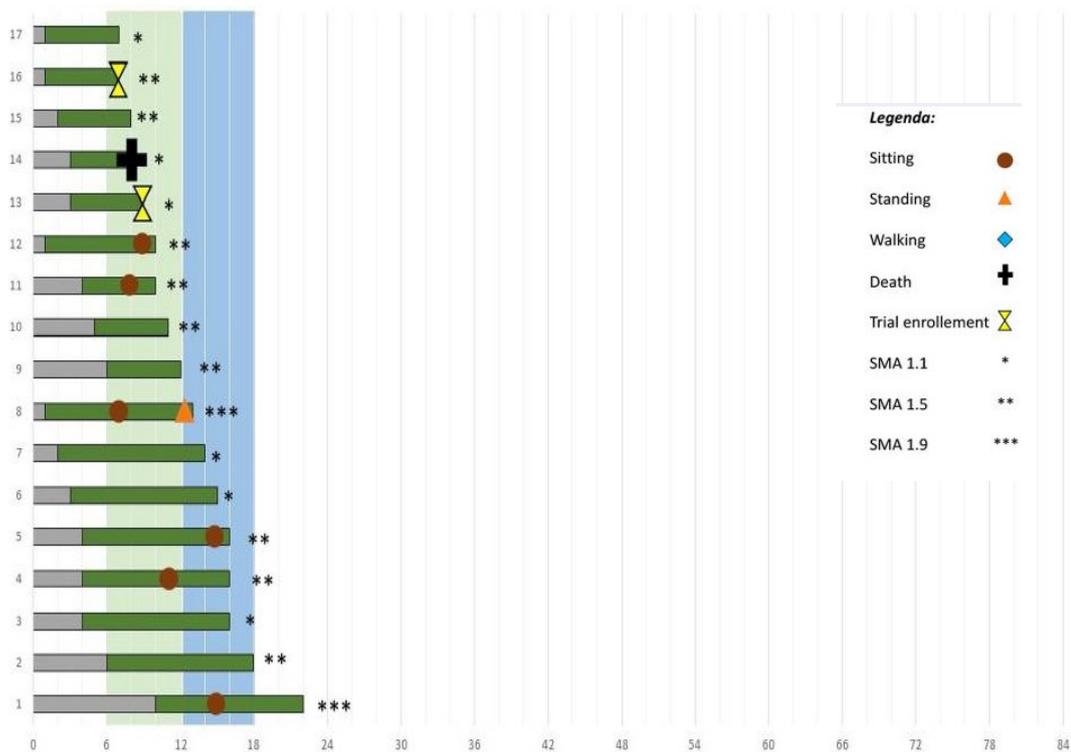
Quattordici dei 38 (37%) avevano raggiunto questo item motorio ancor prima di avviare la terapia genica. Dei restanti 24 (63%) che hanno raggiunto la posizione seduta dopo l'inizio dell'OA, 12 (50%) avevano ricevuto solo la dose di carico di nusinersen. Un paziente è stato in grado di sedersi in modo autonomo a 34 mesi. I restanti 8/46 (17,4%) non hanno raggiunto questo item motorio nonostante lo switch alla terapia genica.

I risultati sono stati rappresentati nella Figura 17.

Presymptomatic



Naïve



Legenda:

- Sitting ●
- Standing ▲
- Walking ◆
- Death ✕
- Trial enrollement △
- SMA 1.1 *
- SMA 1.5 **
- SMA 1.9 ***

Età (mesi)

■ No treatment ■ Pre-treatment ■ Onasemnogene Apeparvovec

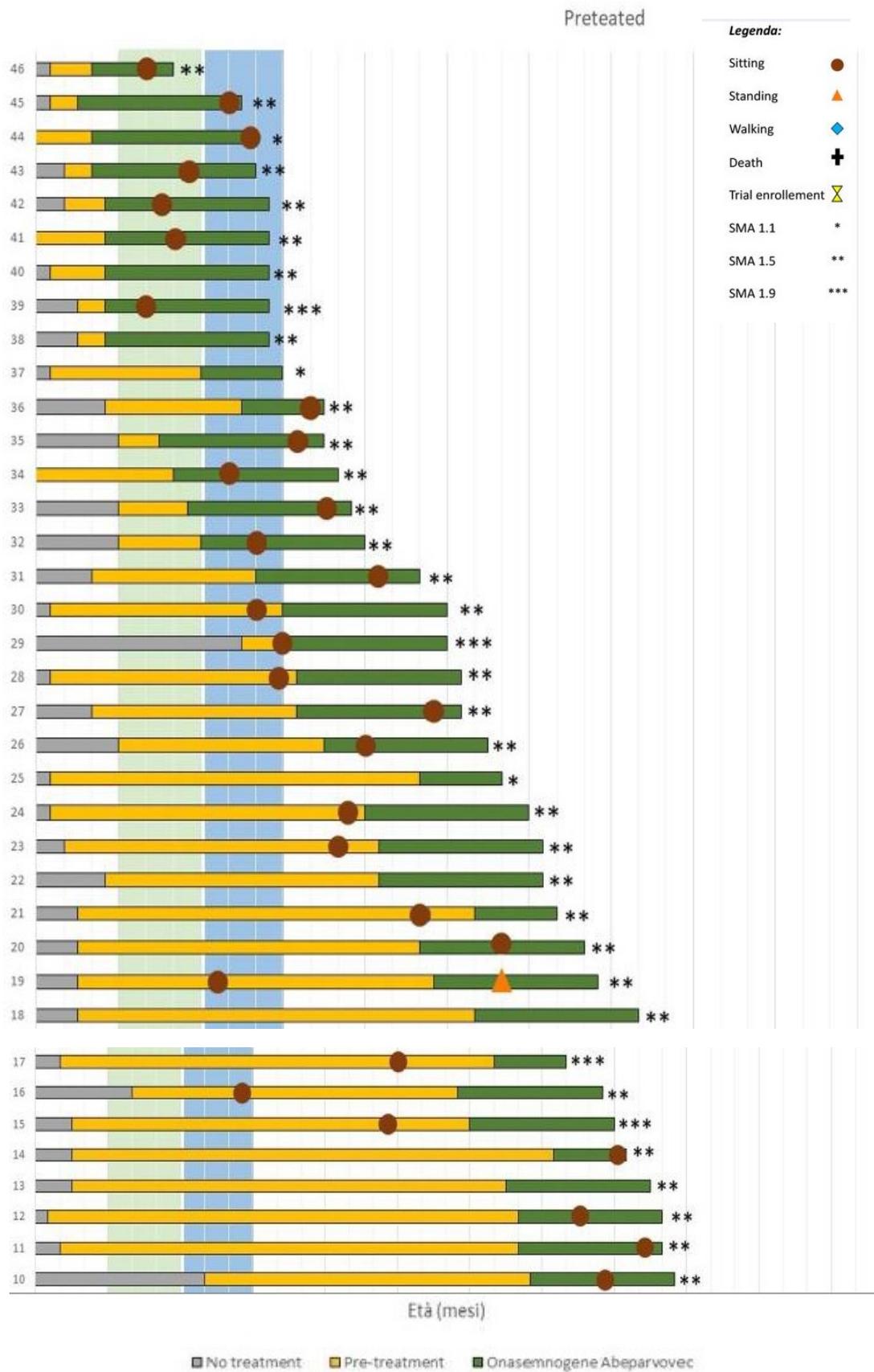


Figura 17: Raggiungimento delle tappe di sviluppo psicomotorio. Le linee verdi indicano il trattamento con onasemnogene abeparvovec, quelle arancioni il trattamento precedente e quelle grigie il periodo senza alcun trattamento.

Dalle analisi statistiche eseguite emerge come la durata del trattamento precedente e il numero di copie del gene SMN2 sono stati gli unici fattori prognostici statisticamente significativi che hanno influito sull'outcome motorio. La gravità della SMA e la durata del precedente trattamento hanno mantenuto la significatività all'analisi multivariabile.

Analizzando l'aspetto bulbare, e quindi la funzionalità respiratoria e la capacità deglutitoria, è stato evidenziato come 36 dei 46 bambini (78%) che non avevano bisogno di supporto nutrizionale T0, dopo 12 mesi dall'infusione della terapia genica hanno conservato la capacità deglutitoria continuando ad alimentarsi esclusivamente per via orale. I restanti dieci (22%) hanno continuato a essere alimentarsi tramite sondino nasogastrico o gastrostomia.

Dieci pazienti (22%) non necessitavano di supporto ventilatorio al T0. 9 di loro (90%) hanno mantenuto l'autonomia respiratoria a distanza di un anno dalla terapia genica (T12); solo per un paziente è stato necessario avviare l'addestramento alla NIV per un tempo inferiore alle 10 ore giornaliere (SMA 1,5). Dei restanti 36 che necessitavano di ventilazione non invasiva (76%) al T0, 32 necessitavano di NIV per un tempo inferiore alle 10 ore giornaliere e 4 per un periodo superiore alle 10 ore giornaliere. Dopo 12 mesi dall'OA, un paziente ha mostrato una riduzione della durata complessiva dell'utilizzo della NIV ed un altro ha interrotto completamente il supporto respiratorio.

In questo studio è stata valutata la sicurezza della terapia genica e gli effetti collaterali riportati nei 67 pazienti.

Nei primi 7 giorni dopo il trattamento, 15 (22,4%) bambini hanno avuto febbre (TC >38), in 14 (20,9%) è stata registrata la comparsa di vomito o sintomi gastrointestinali. Su 67 pazienti, 26 (39%) hanno presentato aumento del valore ematico di AST, mentre 17 un aumento delle ALT. L'andamento delle transaminasi è stato illustrato nella Figura 18.

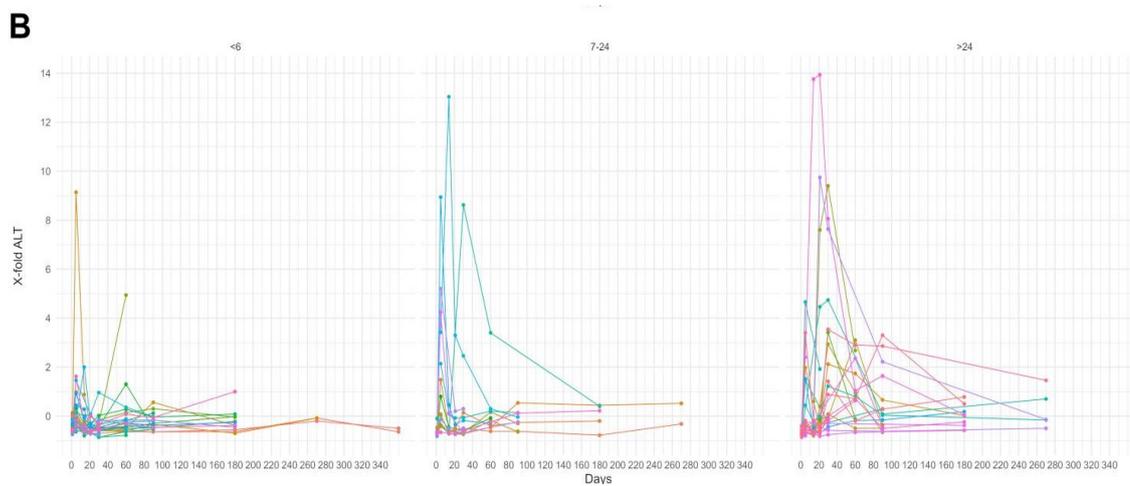
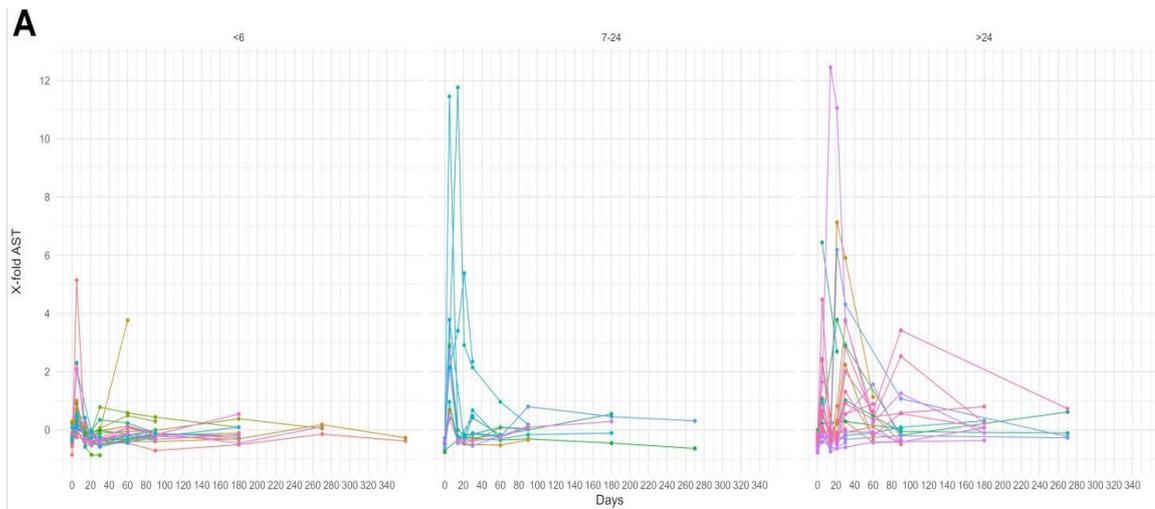


Figura 18: valori AST e ALT suddivise per età al momento del trattamento. Pannello A: x-fold AST; pannello B: x-fold ALT

Nessuno dei pazienti ha presentato segni clinici di sofferenza epatica (ittero, aumento della bilirubina). L'aumento dei valori ematici degli enzimi epatici è stato sempre trattato con aumento contestuale della dose di prednisolone giornaliera: da 1mg/kg/die a 2 mg/kg/die. In nessun caso è stato necessario intervenire con altri farmaci.

Conducendo un'analisi statistica di regressione binomiale negativa si è evidenziato che il rischio di tossicità epatica per i bambini trattati con età >24 mesi è di 11,08 volte più elevato rispetto ai pazienti con età inferiore a sei mesi e 9,07 volte più alto rispetto a quelli trattati tra i 7 e i 24 mesi.

Trombocitopenia (definita come valore di piastrine < $150 \times 10^9/L$) si è verificata in 35 (52%) dei 67 pazienti ad una distanza media dal trattamento di circa di 5-7 giorni. 6 dei 35 (17,14%) bambini hanno mostrato valori di piastrine inferiori a 50000 per cui è stato necessario raddoppiare la dose di steroide. In nessun paziente sono stati rilevati segni di piastrinopenia quali petecchie/porpora/ematomi o emorragie.

Il farmaco si è dimostrato sicuro in ambito cardiologico. Solo in tre pazienti è stato registrato un lieve aumento della troponina non correlata ad alterazioni dell'elettrocardiogramma o dell'ecocardiogramma.

Un bambino ha manifestato linfocitopenia emofagocitica.

Un bambino ha sviluppato idrocefalo 1 mese dopo la somministrazione della terapia genica.

Un paziente è morto a 8 mesi di età vita per un evento traumatico non correlato al trattamento con terapia genica.

Un bambino è morto di encefalite acuta manifestatasi dopo 13 mesi dalla terapia e pertanto non correlabile a OA.

6.3 Discussione

Con questo lavoro sono stati ampliati i dati disponibili sulla terapia genica, cercando di identificare, per la prima volta, i fattori prognostici di sicurezza ed efficacia in bambini con età e peso maggiori rispetto a quelli arruolati nei precedenti trial clinici ed in bambini che erano stati già trattati con altre terapie.

La terapia genica è un farmaco disponibile in diversi paesi, sempre più spesso le famiglie dei bambini SMA e i loro medici curanti si trovano di fronte ad una scelta terapeutica. Fino a poco tempo tale scelta si basava esclusivamente sui dati ricavati da trials clinici, in cui erano stati trattati solo pazienti pre-sintomatici o con età inferiore ai 7 mesi [48,49] che non avevano ricevuto alcuna terapia [51].

In questo lavoro sono stati studiati bambini con età superiore ai sette mesi e con peso superiore ai 8.5Kg; è stato riscontrato un significativo miglioramento dei punteggi della scala CHOP-INTEND tra T0 e T12. Il miglioramento maggiore è stato riscontrato nei neonati identificati mediante screening neonatale. I pazienti con età inferiore ai 6 mesi o con peso inferiore a 8,5 kg hanno avuto punteggi maggiori rispetto ai bambini più grandi.

Dalle analisi condotte è emerso che il punteggio CHOP-INTEND al T0 e l'età al T0 sono i due migliori predittori dell'efficacia della terapia: ossia tanto più il punteggio motorio è alto (e quindi il bambino ha pochi sintomi o la SMA non è ancora clinicamente manifesta) e più la terapia genica potrà essere efficace. Questi risultati sono in accordo con altri studi precedentemente condotti [50,52,53].

Una delle principali domande da porsi quando si propone il passaggio da un modulatore dello splicing del gene SMN2 alla terapia genica è se il nuovo farmaco fornirà ulteriori miglioramenti rispetto a quelli già ottenuti dal precedente trattamento. Nella nostra coorte circa un terzo dei pazienti sintomatici trattati con nusinersen era già in grado di sedersi autonomamente, prima ancora dell'avvio della terapia genica. Più di un terzo ha raggiunto la capacità di sedersi dopo la somministrazione di OA e dopo aver ricevuto diverse dosi di nusinersen. L'interpretazione di questi dati è difficile poiché la popolazione analizzata è estremamente eterogenea. Le analisi di regressione condotte hanno valutato l'effetto delle variabili: il maggior numero di copie del gene SMN2, il sottotipo di SMA 1 più lieve, la maggior durata del trattamento precedente possono essere considerati tutti fattori prognostici statisticamente significativi.

Il profilo di sicurezza nella nostra coorte è risultato complessivamente simile a quello riportato negli studi clinici. La sopravvivenza è stata del 97%, in linea con i risultati dei precedenti studi clinici. Nei due bambini deceduti la causa dell'exitus non è stata imputata al trattamento. Non è stato registrato alcun evento avverso serio quale insufficienza epatica acuta o microangiopatia trombotica.

La diminuzione delle piastrine e l'aumento degli enzimi epatici sono state le alterazioni più frequentemente riportate; come già descritto nei precedenti studi clinici, l'aumento di AST e ALT avviene in due momenti: il primo dopo 10-14 giorni dalla somministrazione della terapia genica, il secondo dopo circa 4 e 6 settimane [52,54,55]. Questi risultati ribadiscono ancora una volta l'importanza di proseguire un follow up a lungo termine. Seppur lieve gli eventi avversi sono stati registrati più frequentemente nei bambini di età e/o peso maggiore.

In conclusione, possiamo affermare che i risultati ottenuti confermano l'efficacia della terapia genica nei bambini SMA trattati a diverse età; con questo studio abbiamo fornito un'ulteriore conferma della necessità di prolungare il monitoraggio emato-clinico in modo da poter riconoscere e trattare precocemente eventuali eventi avversi. La terapia genica è efficace anche nei pazienti SMA più grandi e in quelli precedentemente trattati con terapie modulatrici dello splicing del gene SMN2, tuttavia la risposta clinica e il miglioramento motorio sono molto variabili e sono meno evidenti rispetto ai neonati trattati identificati mediante screening neonatale. I risultati ottenuti dal *real world* possono essere di aiuto nella scelta della terapia sia per il medico che per le famiglie, le quali propendono per il cambio di farmaco sperando di ottenere gli stessi risultati dei pazienti trattati in epoca pre sintomatica. Anche se sono stati arruolati 67 pazienti, nel momento in cui la popolazione viene suddivisa nei diversi sottogruppi (età/sottotipi di SMA/numero di copie del gene SMN2) il numero del campione analizzato rimane esiguo per trarre conclusioni definitive. Il numero di variabili da considerare diventa ancora più grande se si includono i diversi tipi di SMA. Sarà quindi necessario eseguire studi internazionali più ampi in modo da poter unire risultati diversi e fornire un set di dati più ampi per poter ideare un modello automatico che identifichi il tipo di terapia più appropriata per quel paziente abbracciando così il concetto di medicina personalizzata.

7. La pletismografia a luce strutturata per la valutazione non invasiva del pattern respiratorio nell'atrofia muscolare spinale di tipo 1.

L'atrofia muscolare spinale di tipo 1 (SMA1) è una grave patologia genetica che porta a un'insufficienza respiratoria precoce. Negli ultimi anni la storia naturale della malattia è cambiata grazie all'avvento delle nuove terapie. Con l'aumento dell'aspettativa di vita i bambini SMA mostrano nuovi fenotipi clinici, presentando cambiamenti non solo nell'aspetto motorio, ma anche in ambito respiratorio, nutrizionale, nello sviluppo cognitivo e del linguaggio. Si evidenzia, sempre di più, la necessità di avere degli strumenti di valutazione specifici che consentano di rilevare anche i più piccoli cambiamenti in questi pazienti. La giovane età e la gravità dei bambini SMA1, in assenza di terapia, hanno limitato la possibilità di sviluppare specifici outcome respiratori.

L'insufficienza respiratoria nella SMA 1 viene ad instaurarsi precocemente a causa della severa ipotonia che coinvolge i muscoli intercostali con relativo risparmio del diaframma. A causa dell'ipofunzione di questi muscoli i bambini affetti sviluppano il cosiddetto "respiro paradossale" ossia l'utilizzo della muscolatura accessoria, quale quella addominale, per garantire corretti scambi gassosi durante l'atto respiratorio [31-32]. Nelle prime fasi della vita, i bambini SMA 1, sviluppano un disturbo nella respirazione notturna, caratterizzato da ipercapnia e successivamente ipossia, che richiede una correzione mediante supporto ventilatorio con la ventilazione non invasiva (NIV) o invasiva [33,34]. Prima dell'avvento di terapie specifiche l'insufficienza respiratoria era la principale causa di morte entro i primi due anni di vita nei bambini SMA1.

Negli ultimi anni, la combinazione di un approccio multidisciplinare e la disponibilità di nuovi trattamenti per i bambini affetti da SMA di tipo 1 ha portato a un miglioramento generale dello stato respiratorio dei pazienti con conseguente allungamento della sopravvivenza [35,36]. Tuttavia, mancano ancora strumenti oggettivi e ripetibili per valutare la funzione respiratoria, soprattutto in considerazione della giovane età e della scarsa collaborazione di questi bambini.

In questo studio proponiamo la pletismografia a luce strutturata (Structured Light Plethysmography, SLP) come metodo di valutazione non invasivo per studiare, in modo dettagliato, la dinamica respiratoria nei bambini SMA 1 non collaboranti. Successivamente i dati di l'outcome respiratorio ottenuti mediante SLP sono stati correlati con le caratteristiche cliniche e le abilità motorie dei pazienti inclusi nello studio.

La SLP rileva i movimenti del torace e dell'addome proiettando una griglia di luce sulla parete toraco-addominale anteriore. Lo spostamento assiale della griglia luminosa, registrato da videocamere digitali, misura il movimento toraco-addominale durante la respirazione per un periodo di tempo definito (fino ad un massimo di 5 minuti). Le analisi di post-elaborazione del software integrato SLP forniscono ulteriori risultati, come i tempi respiratori e gli indici di pattern respiratorio (cioè il contributo del torace e dell'addome per ciascun respiro e il grado di sincronia toraco-addominale) [39]. E' possibile utilizzare la pletismografia per valutare bambini piccoli e non collaboranti [40]. Tale strumento viene già utilizzato per analizzare il pattern respiratorio in pazienti affetti da asma [41]. Un recente studio ha dimostrato la possibilità di applicare la SLP nei bambini con distrofia muscolare di Duchenne [31]. La SLP è stata in grado di rilevare caratteristiche peculiari del pattern respiratorio, come un ridotto contributo addominale ad ogni atto respiratorio [31].

7.1 Materiali e metodi

E' stato eseguito uno studio prospettico trasversale in bambini SMA di tipo 1 afferenti all'Unità Operativa di Neurologia Pediatrica e Malattie muscolari dell'Istituto Giannina Gaslini. Il protocollo dello studio è stato approvato dal Comitato Etico Regionale; prima dell'arruolamento è stato ottenuto il consenso verbale dai genitori/caregiver per tutti i bambini. L'acquisizione del consenso verbale è stata documentata nella cartella clinica del paziente. Sono stati inclusi bambini con età <18 anni, con una diagnosi genetica di SMA e caratteristiche cliniche coerenti con la definizione di SMA di tipo 1, ovvero insorgenza dei sintomi prima dei 6 mesi di età, incapacità di stare seduti senza sostegno. I pazienti arruolati potevano avere necessità di supporto respiratorio per meno di 16 ore al giorno. Abbiamo escluso

dallo studio pazienti con grave scoliosi (COBB >30) a causa della grave asimmetria toracica e addominale che ne consegue.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a visite cliniche periodiche durante le quali sono stati rilevati dati antropometrici (altezza, peso, circonferenza toracica) e raccolti dati anamnestici riguardanti l'esecuzione regolare della fisioterapia respiratoria domiciliare, l'uso del dispositivo di assistenza alla tosse, il tipo di supporto respiratorio (invasivo o non invasivo) e le ore di supporto ventilatorio giornaliero. Sono state raccolte informazioni sul tipo di alimentazione, sulla presenza di gastrostomia o sondino naso gastrico. Successivamente è stata eseguita la registrazione SLP per una durata complessiva di cinque minuti. Infine, il fisioterapista neuromuscolare esperto ha effettuato valutazioni motorie utilizzando le scale standardizzate per patologia quali l'Hammersmith Infant Neurological Examination (HINE) e la Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders (CHOP-Intend).

La frequenza respiratoria di ciascun paziente è stata valutata visivamente e mediante SLP ed è stata confrontata con la normale frequenza respiratoria di bambini sani di pari età [42].

La valutazione del pattern respiratorio è stata effettuata con il dispositivo SLP PneumaCare Thora3DI® (Cambridgeshire, Regno Unito) abbinato al proiettore di luce Thora 3DI®. Il modello di respirazione è stato misurato utilizzando una griglia di luce, tracciata da un sistema di visione digitale di due telecamere ad alta velocità. Ogni paziente ha eseguito una registrazione pletismografica di cinque minuti in posizione supina ed in aria ambiente. Tutte le registrazioni sono state effettuate con i bambini a petto nudo. Erano disponibili tre dimensioni della griglia luminosa (piccola, media e grande) in base al numero di quadrati (14×10 , 12×8 , 10×6). Per tutte le registrazioni abbiamo utilizzato la griglia SLP di dimensioni medie, posizionata prendendo come repere il processo xifoideo dello sterno, considerando "torace" la regione che va dalle clavicole al processo xifoideo dello sterno e "addome" la regione che va dal processo xifoideo dello sterno alle creste iliache anteriori.

I pazienti sono stati posizionati a una distanza massima di 1 metro dal proiettore SLP, in modo da mantenere margini netti della griglia luminosa, come illustrato nella Figura 19.



Figura 19: Dispositivo PneumaCare Thora3DI® System e acquisizione del pattern respiratorio in un bambino con SMA di tipo 1. Protocollo di acquisizione del pattern respiratorio tramite pletismografia a luce strutturata.

I dati raccolti sono stati analizzati tramite il software integrato PneumaView™ 3D attraverso il quale è possibile ottenere una ricostruzione tridimensionale del torace e dell'addome del paziente durante il tempo di registrazione e una rappresentazione grafica del pattern respiratorio con i movimenti respiratori del torace e dell'addome rappresentati come onde sinusoidali (Figura 20).

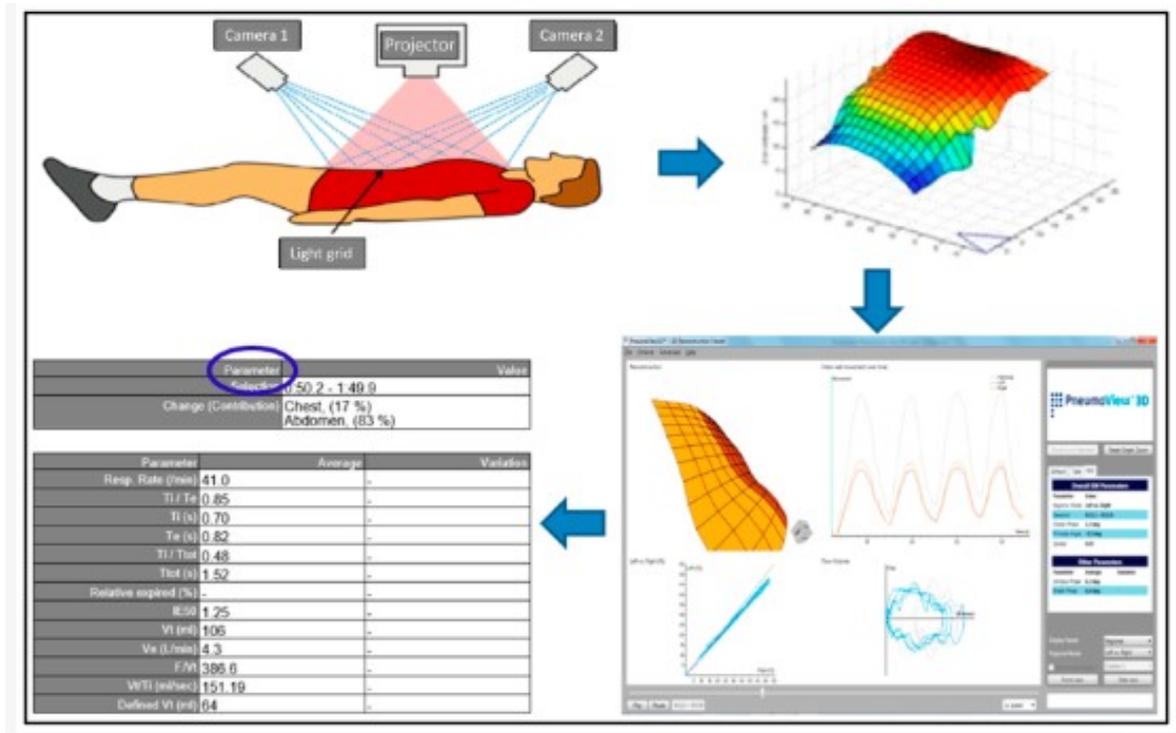


Figura 20: Acquisizione, registrazione ed elaborazione dei dati tramite PneuView™ 3D. Il PneuCare Thora3DI® ha proiettato una griglia luminosa sul torace del paziente in posizione supina (in alto a sinistra). Lo spostamento della griglia luminosa toraco-addominale è stato ricostruito tridimensionalmente dal PneuView™ 3D (in alto a destra). Dopo la registrazione, il PneuView™ 3D ha fornito un output visivo (in basso a destra) e numerico (in basso a sinistra) delle informazioni disponibili per le analisi. Le frecce blu indicano la sequenza di registrazione del pattern respiratorio e di acquisizione dei dati. Il cerchio blu indica i parametri rilevanti forniti da PneuView™ 3D.

La sincronia del torace e dell'addome durante ogni atto respiratorio è stata espressa come “*L'angolo di fase*” definito come la differenza di fase tra il tracciato del torace e quello dell'addome, la forma del grafico che ne deriva, chiamata Konno-Mead (KM), viene utilizzata per indicare l'entità dell'asincronia tra torace ed addome. Quando il torace e l'addome si muovono in perfetta sincronia, l'anello KM è piatto e l'angolo di fase è pari a zero (cioè non c'è differenza tra le fasi di movimento del torace e dell'addome ed entrambi sono in inspirazione o in espirazione nello stesso momento). Quando compare l'asincronia, l'anello KM si apre; l'asincronia completa (movimenti paradossali) si traduce, invece, in un anello KM piatto e in un angolo di fase di 180° (cioè i movimenti del torace e dell'addome sono completamente sfasati, quando una regione è in fase di espirazione l'altra è in fase di inspirazione e viceversa). Abbiamo, quindi, definito l'asincronia toraco-addominale come angolo di fase i cui valori oscillano tra 0° 180° , la respirazione paradossa corrisponde ad un angolo di fase pari a 180° (Fig. 21).

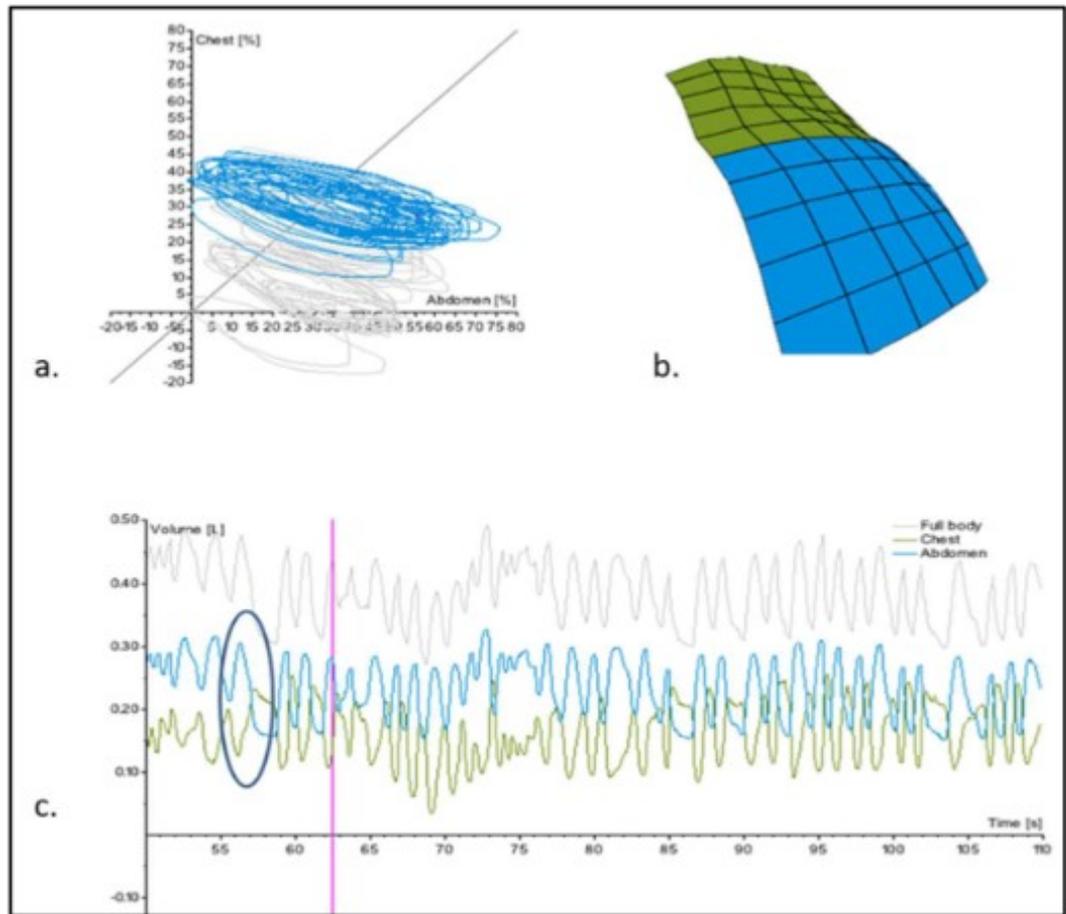


Figura 21: Output visivo del modello di respirazione di un paziente fornito da PneumaView™ 3D. (a) Anello di Konno-Mead che mostra il contributo prevalente (percentuale) dell'addome rispetto al torace in ciascun respiro registrato. Quando il contributo è equamente distribuito, l'asse principale del loop è parallelo a 45° e l'angolo principale è 0° . Nel loop qui rappresentato, l'angolo principale (l'angolo tra la linea dei 45° e l'asse principale della curva di Konno-Mead) è negativo e indica una componente prevalente della respirazione addominale. (b) Ricostruzione tridimensionale del torace (verde) e dell'addome (blu) del paziente durante la respirazione. (c) Rappresentazione sinusoidale del movimento del torace (verde) e dell'addome (blu) durante la respirazione. Il modello di respirazione è caratterizzato da uno sfasamento toraco-addominale e da una respirazione paradossa (cerchio blu). La linea rosa indica la registrazione (60 s) salvata per l'analisi dell'andamento della respirazione.

Gli ulteriori parametri ricavati dall'esecuzione della pletismografia sono stati:

1. **% relativa di torace espanso e % relativa di addome espanso:** Considerando la regione toraco-addominale come composta da due compartimenti, ossia il torace e l'addome, il contributo relativo di ciascun comparto è stato quantificato come percentuale dello spostamento totale.
2. **La frequenza respiratoria (RR)** è stata espressa come numeri di atti respiratori al minuto. La frequenza respiratoria è stata utilizzata come indicatore dello sforzo respiratorio che i pazienti devono compiere per mantenere livelli adeguati di saturazione di ossigeno e di anidride carbonica.

L'indice di respirazione superficiale rapida (RSBi) è un parametro che esprime la capacità del paziente di muovere adeguati volumi d'aria ad ogni atto respiratorio. L'indice di respirazione superficiale rapida (RSBi) è utilizzato soprattutto in terapia intensiva come predittore di estubazione [43]. In questo studio, l'RSBi è stato calcolato come il rapporto tra la frequenza respiratoria dei pazienti e il volume corrente (V_t), entrambi ricavati dalla stessa registrazione SLP. Tuttavia le misure volumetriche non sono calcolate direttamente dalla SLP, essendo questa una misurazione bidimensionale. Una stima del volume corrente (V_t) di 8 ml/kg è stata inserita manualmente in base al peso del paziente. Tutte le variabili descritte sono state successivamente correlate con i valori antropometrici e con i punteggi ottenuti dalle scale motorie HINE e CHOP INTED, precedentemente validate in bambini con SMA di tipo 1 [42,44].

Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando la versione 24 di IBM SPSS®. Data la dimensione relativamente piccola del campione, sono state utilizzate analisi non parametriche. I dati descrittivi sono stati espressi come mediana e range interquartile (25°-75° centile). Il test di Wilcoxon è stato utilizzato per confrontare la frequenza respiratoria della nostra popolazione con la frequenza respiratoria di bambini sani. Infine, le correlazioni tra la frequenza respiratoria e le variabili cliniche/antropometriche o le valutazioni della funzione motoria sono state effettuate mediante la correlazione di Spearman.

7.2 Risultati

Abbiamo valutato 19 bambini con SMA di tipo 1, di cui 13 maschi. L'età mediana alla valutazione era di 2,3 anni (IQR 1,3-7,9). I dettagli della popolazione studiata sono riassunti nelle Tabelle 10 e 11.

N=19	N (%)	Median age (IQR)
Male	13 (68%)	
Age (years)		2.3 (1.3-7.9)
Age of onset (years)		0.3 (0.2-0.4)
Age at diagnosis (years)		0.6 (0.3-0.9)
Use of cough assist (y)	19 (100%)	
Age starting ventilatory support (months)		10.5 (5.5-24)
Ventilatory support	17 (89%)	
- Invasive	4	
- Non-Invasive	13	
Ventilation requirement		
- 1-8 hours/day	6	
- 9-16 hours/day	6	
- 17-23 hours/day	5	
Orthopaedic features		
- Scoliosis (y)	10 (53%)	
- Joint contractures	14 (74%)	
Feeding		
- Oral	6	
- Nasogastric tube	3	
- Age at NG (months)		9 (5-14.5)
- Gastrostomy	10	
- Age at gastrostomy (months)		23 (11-26)
Comorbidities		
- Interatrial septum defect	2	
- Pre-term birth	2	
- Oculocutaneous albinism	1	
- Adenotonsillar hypertrophy	1	
Concomitant therapies		
- Salbutamol	4	
CHOP at assessment	15	32 (20-34)
HINE at assessment	16	52 (46-57)

Tabella 10: caratteristiche cliniche della popolazione in studio

N=19	N (%)	Median (IQR)	WHO percentile
Height (cm)	16	89.5 (75-118.3)	9 th – 25 th percentile
Weight (kg)	16	10.2 (7.2-17.9)	< 3 rd percentile
BMI (m/kg²)	16	13.2 (11.5-14.7)	< 3 rd percentile
Chest circumference (cm)	11	47.5 (41-57.5)	

Tabella 11: dati antropometrici della popolazione studiata

I movimenti respiratori del torace e dell'addome di tutti i pazienti sono stati registrati in posizione supina, posizionati in un letto d'ospedale in regime ambulatoriale. In tutti i pazienti è stata eseguita con successo una registrazione SLP continua di cinque minuti. Nella Tabella 12 sono stati riportati tutti i dati ricavati durante la registrazione; la Figura 21 mostra un esempio degli output visivi forniti dalla pletismografia.

SLP Parameters	Median (IQR)	Reference Value (Healthy Subjects)	Clinical Expression of Respiratory Pattern in SMA Type 1
Respiratory rate (bpm)	33.5 (26.6–41.7)	²⁷ CI 95% (26–28) age 2.3 [28]	Increased RR
Vt (mL) pre-imposed (8 mL/kg)	79.0 (57–140.5)		
Vt (mL) *	95.5 (56.2–120.3)		
Vt (mL)/Vt (mL) pre-imposed (%)	94 (75.6–117.6)		
RSBi (RR/Vt (L)) *	342.1 (236.5–457.9)		Rapid Shallow Breathing
RSBi (RR/mL/kg) *	3.9 (3.2–5.4)		
Relative Expired Abdomen (%)	77 (68–90)		
Relative Expired Chest (%)	23 (10–32)		Prevalent diaphragmatic component physiological in supine position
Chest contribution to Vt (%)		⁵⁹ CI 95% (45.4–72.6) age 2.3 [28]	
Phase Angle (°)	48.7 (41.6–63.2)	^{11.8} CI 95% (10.2–13.4) age 2.9 [28]	Increased thoraco-abdominal asynchrony

* Vt (mL) was calculated by the SLP software by averaging a pre-imposed standard Vt of 8 mL/patients' weight in kg entered manually for the number of breaths within the time of recording.

Tabella 12: Sintesi dei parametri respiratori acquisiti mediante registrazione SLP di un minuto, valori di riferimento per fascia d'età e significato clinico.

L'analisi dell'acquisizione dei dati ha mostrato un angolo di fase positivo per tutti i pazienti registrati, ciò dimostra la presenza di un certo grado di asincronia toraco-addominale. Il valore assoluto dell'angolo di fase varia da 34,3° a 144,4°, nessuno dei pazienti arruolati nello studio presenta, quindi, un pattern respiratorio completamente sincrono o completamente paradossale.

Il valore mediano dell'angolo di fase è di 48,7° (IQR 41,6-33), superiore ai valori di riferimento (11,8°) riscontrati in bambini sani della stessa età [45].

Nei pazienti SMA 1 il contributo della muscolatura addominale in ciascun atto respiratorio è superiore rispetto al contributo fornito dalla muscolatura toracica. Il valore mediano *della % relativa dell'addome espanso* registrato è del 77%, mentre il valore mediano *della % relativa di torace espanso* è del 23% ($p < 0,05$).

Il valore mediano della frequenza respiratoria è di 33,5 (26,6-41,7) atti respiratori/min, superiore ai dati dei soggetti sani di pari età [45].

Infine, il valore mediano dell'indice di respirazione rapida e superficiale (RSBi) è 342,1 (236,5-457,9), particolarmente elevato se si considera che qualsiasi valore superiore a 105 è associato a un quadro di insufficienza respiratoria [46].

I dati ricavati dalla registrazione SLP sono stati correlati alla circonferenza toracica dei pazienti, al loro BMI e alle ore di supporto ventilatorio giornaliero.

Nei pazienti con una frequenza respiratoria più elevata e/o con una circonferenza toracica più piccola, che necessitavano di più ore di ventilazione giornaliera, è stata registrata un maggior contributo della muscolatura addominale (espresso come % di addome), ma non è stata trovata una correlazione significativa.

I pazienti con una circonferenza toracica più piccola avevano un valore più alto dell'indice di respirazione rapida e superficiale (RSBi.) ($r -0,7$, $p < 0,01$). Il grado di RSBi non è stato correlato, tuttavia, con un maggiore numero di ore di supporto ventilatorio

I dati ottenuti dalla pletismografia sono stati successivamente confrontati con i punteggi motori ottenuti dalle scale HINE e CHOP INTEND, eseguite per ogni paziente lo stesso giorno di registrazione pletismografica

È stata evidenziata una correlazione negativa tra l'angolo di fase e la scala CHOP-INTEND ($r -0,8$, $p < 0,01$) ma non con il punteggio ottenuto dalla scala HINE. Le ore

di ventilazione giornaliera dei pazienti correlano negativamente con i punteggi della scala HINE ($r -0,8$, $p < 0,01$), ma non con la CHOP-INTEND, anche se è stato osservato un trend negativo, ($r -0,8$, $p < 0,01$) (Fig. 22).

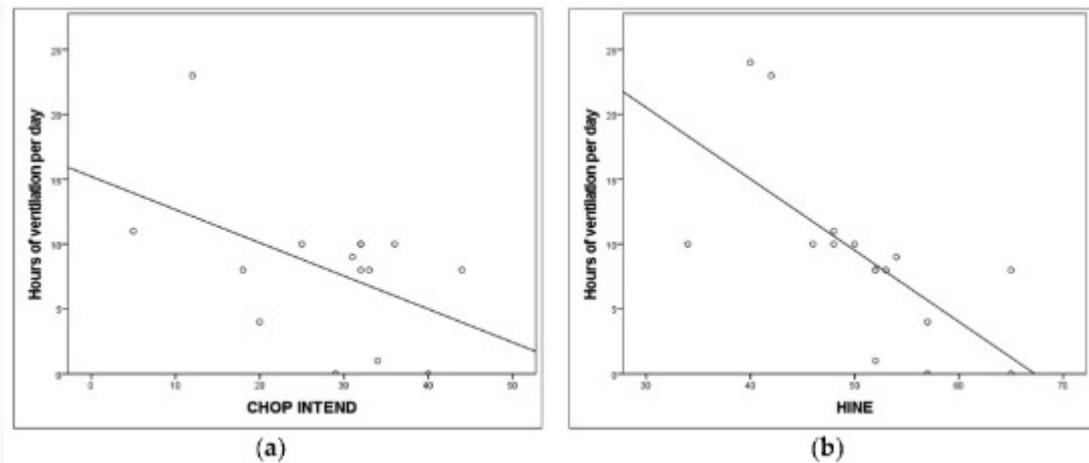


Figura 22: Correlazione tra necessità di ventilazione e funzione motoria nella SMA di tipo 1. (a) CHOP-INTEND. (b) Hammersmith Infant Neurological Examination HINE.

7.3 Discussione

Per la prima volta, con questo studio, abbiamo utilizzato la pletismografia a luce strutturata (SLP) per valutare il pattern respiratorio in una popolazione pediatrica SMA 1. L'utilizzo della SLP non richiede la collaborazione del paziente, è facile da eseguire e ben tollerata da tutti i bambini.

Nel complesso, il pattern respiratorio registrato dalla SLP, è stato caratterizzato dai ben noti segni distintivi della SMA1: (i) respirazione rapida e superficiale (indice RSBi elevato), (ii) respirazione prevalentemente addominale (% addome espanso elevata), (iii) asincronia toraco-addominale.

Ognuna di queste tre caratteristiche respiratorie è stata correlata con i punteggi motori e i parametri antropometrici dei 19 pazienti arruolati nello studio.

I bambini con il più alto indice RSBi sono quelli con la circonferenza toracica più piccola (conformazione del torace cosiddetto a campana). Ciò conferma che, nella SMA di tipo 1, per compensare i piccoli valori di volume corrente mossi ad ogni atto respiratorio si associa una elevata frequenza respiratoria.

Nella SMA 1, come già precedentemente detto, il contributo della muscolatura addominale è maggiore rispetto all'escursione della gabbia toracica [36]. Questo dato è l'espressione dell'ipotonia dei muscoli intercostali senza coinvolgimento del diaframma. Anche nella nostra coorte i bambini che avevano una % relativa di contributo addominale minore, richiedevano un ridotto numero di ore di ventilazione giornaliera. I pazienti in cui è stata registrata una marcata asincronia toraco addominale necessitavano, invece, di un supporto ventilatorio continuativo.

I bambini SMA 1 con un'asincronia toraco-addominale più evidente, sono quelli più compromessi da un punto di vista motorio (cioè con un punteggio basso alla scala di valutazione CHOP-INTEND).

In conclusione è possibile affermare che la pletismografia a luce strutturata può essere utilizzata come strumento di valutazione affidabile per l'outcome respiratorio nei piccoli pazienti affetti da atrofia muscolare spinale, non collaboranti per età. Le misure oggettive del pattern respiratorio potrebbero integrare le valutazioni motorie nella SMA ed aiutare i medici, ad esempio, a identificare precocemente i bambini che necessitano di un supporto ventilatorio, prima che esso sia clinicamente manifesto. In ambito di ricerca, la SLP potrebbe supportare l'acquisizione di nuove misure di outcome nel contesto di studi clinici anche alla luce delle nuove terapie emergenti. Obiettivo futuro è quello di utilizzare la pletismografia in paziente SMA che hanno ricevuto terapia specifica (nusinersen, risdiplam, genica) in modo da poter oggettivare i miglioramenti ottenuti in ambito respiratorio.

CONCLUSIONI

Fino a poco tempo fa il trattamento della SMA era basato su approcci multidisciplinari e finalizzato a migliorare la qualità di vita e prolungare la sopravvivenza dei bambini affetti. Negli ultimi anni, la storia di questa malattia è radicalmente cambiata; le nuove prospettive terapeutiche, focalizzate sui meccanismi genetici alla base della patologia, portano ad un vero recupero funzionale con la possibilità di acquisire tappe dello sviluppo psicomotorio non ottenute in precedenza e/o di stabilizzare il quadro clinico impedendo la progressione della malattia.

Utilizzando come metodi di valutazione le scale motorie standardizzate per patologia abbiamo dimostrato come l'utilizzo di una terapia specifica (modulatore dello splicing o terapia genica) nei pazienti SMA 1 sia in grado di migliorare l'*outcome* motorio e di mantenere il risultato stabile nel tempo. Dai dati analizzati emerge che tanto più precocemente viene avviata la terapia tanto più essa sembra essere efficace. I pazienti, che hanno avviato più tardivamente il trattamento sono in grado di mantenere le abilità motorie precedentemente acquisite, ritardando, così, il decorso della malattia, ma più raramente ne acquisiscono di nuove. La diagnosi precoce ha un ruolo fondamentale per ottenere maggiore efficacia dal trattamento. La possibilità di accesso allo screening neonatale migliora ulteriormente la prognosi di questi pazienti rendendo possibile l'avvio delle terapie disponibili fin dai primi giorni di vita.

La disponibilità delle nuove terapie ha modificato la storia naturale dei bambini SMA 1: emergono nuovi fenotipi clinici che presentano cambiamenti non solo nell'aspetto motorio, ma anche in ambito respiratorio; da qui la necessità di ricercare nuovi strumenti oggettivi di valutazione. La pletismografia a luce strutturata (SLP) può essere utilizzata per definire l'*outcome* respiratorio nei piccoli pazienti affetti da atrofia muscolare spinale, non collaboranti per età. Le misure oggettive del pattern respiratorio così ottenute possono integrare le valutazioni motorie ed aiutare i medici, a identificare precocemente i bambini che necessitano di un supporto ventilatorio. In ambito di ricerca, la SLP potrebbe supportare l'acquisizione di nuove misure di *outcome* nel contesto di studi clinici; obiettivo futuro è quello di utilizzare la pletismografia in pazienti SMA che hanno ricevuto terapia specifica (nusinersen,

risdiplam, genica) in modo da poter oggettivare i miglioramenti ottenuti in ambito respiratorio.

Alla luce di questa nuova “rivoluzione fenotipica” ulteriori studi internazionali, più ampi, si rendono necessari per poter descrivere al meglio questo nuovo scenario e creare delle linee guida di indirizzo terapeutico. Gli sforzi collaborativi tra ricercatori, aziende farmaceutiche, organizzazioni governative e associazioni di pazienti sono essenziali per guidare l'innovazione e migliorare la qualità della vita dei pazienti affetti da SMA.

Bibliografia

- [1] Mercuri E, Bertini E, Iannaccone ST. Childhood spinal muscular atrophy: controversies and challenges. *Lancet Neurol.* 2012; 11: 443–52
- [2] Finkel RS, Sejersen T, Mercuri E; ENMC SMA Workshop Study Group. 218th ENMC International Workshop: Revisiting the consensus on standards of care in SMA Naarden, The Netherlands, 19-21 February 2016. *Neuromuscul Disord.* 2017 Jun; 27(6):596-605.
- [3] Wang CH, Finkel RS, Bertini ES, Schroth M, Simonds A, Wong B, Aloysius A, Morrison L, Main M, Crawford TO, Trela A; Participants of the International Conference on SMA Standard of Care. Consensus statement for standard of care in spinal muscular atrophy. *J Child Neurol.* 2007 Aug; 22(8):1027-49.
- [4] Lipnick SL, Agniel DM, Aggarwal R, Makhortova NR, Finlayson SG, Brocato A, et al. Systemic nature of spinal muscular atrophy revealed by studying insurance claims. *PloS One* 2019; 14: e0213680. doi: 10.1371/journal.pone.0213680.
- [5] Wang CH, Finkel RS, Bertini ES, Schroth M, Simonds A, Wong B, Aloysius A, Morrison L, Main M, Crawford TO, Trela A; Participants of the International Conference on SMA Standard of Care. Consensus statement for standard of care in spinal muscular atrophy. *J Child Neurol.* 2007 Aug; 22(8):1027-49.
- [6] Gregorino Paone, Vittoria Conti, Giuseppe Biondi-Zoccai, et al, Long-Term Home Noninvasive Mechanical Ventilation Increases Systemic Inflammatory Response in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Prospective Observational Study, *Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation* Volume 2014, Article ID 503145
- [7] Finkel RS, Chiriboga CA, Vajsar J, et al: Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: A phase 2, open-label, dose-escalation study. *Lancet* 388:3017-3026, 2016
- [8] De Vivo DC, Bertini E, Swoboda KJ, et al: Nusinersen initiated in infants during the presymptomatic stage of spinal muscular atrophy: Interim efficacy and safety results from the Phase 2 NURTURE study. *Neuromuscul Disord* 29:842-856, 2019
- [9] Mercuri E, Darras BT, Chiriboga CA, et al: Nusinersen versus sham control in later-onset spinal muscular atrophy. *N Engl J Med* 378:625-635, 2018

- [10] Darras BT, Chiriboga CA, Iannaccone ST, et al: Nusinersen in later-onset spinal muscular atrophy: Long-term results from the phase 1/2 studies. *Neurology* 92, 2019 . e2492-e2506
- [11] Cheung AK, Hurley B, Kerrigan R, et al: Discovery of small molecule splicing modulators of survival motor neuron-2 (SMN2) for the treatment of spinal muscular atrophy (SMA). *J Med Chem* 61:11021-11036, 2018
- [12] Chen TH: New and developing therapies in spinal muscular atrophy: From genotype to phenotype to treatment and where do we stand? *Int J Mol Sci* 21, 2020, 3297
- [13] Mendell JR, Al-Zaidy S, Shell R, et al: Single-dose gene-replacement therapy for spinal muscular atrophy. *N Engl J Med* 377:1713-1722, 2017
- [14] Shirley JL, de Jong YP, Terhorst C, Herzog RW: Immune responses to viral gene therapy vectors. *Mol Ther* 28:709-722, 2020
- [15] Emanuela Abiusi, Alessandro Vaisfeld, Stefania Fiori, Agnese Novelli, Serena Spartano, Maria Vittoria Faggiano, Teresa Giovanniello, Antonio Angeloni, Giovanni Vento, Roberta Santoloci, Francesca Gigli, Adele D'Amico, Simonetta Costa, Alessia Porzi, Mara Panella, Chiara Ticci, Marta Daniotti, Michele Sacchini, Ilaria Boschi,⁸ Enrico Bertini, Antonio Lanzone, Giancarlo Lamarca, Maurizio Genuardi, Marika Pane, Maria Alice Donati, Eugenio Mercuri, Francesco Danilo Tiziano: on behalf of the Italian SMANBS group Experience of a 2-year spinal muscular atrophy NBS pilot study in Italy: towards specific guidelines and standard operating procedures for the molecular diagnosis. *J Med Genet*: first published as 10.1136/jmg-2022-108873 on 22 November 2022
- [16] Darras BT, Masson R, Mazurkiewicz-Beldzinska M, et al. Risdiplam-treated infants with type 1 spinal muscular atrophy versus historical controls. *N Engl J Med*. 2021;385(5):427-435.
- [17] Marika Pane, Giorgia Coratti, Valeria A. Sansone, Sonia Messina, Michela Catteruccia, Claudio Bruno, Maria Sframeli, Emilio Albamonte, Marina Pedemonte, Noemi Brolatti, Irene Mizzone, Adele D'Amico, Chiara Bravetti, Beatrice Berti, Concetta Palermo, Daniela Leone, Francesca Salmin, Roberto De Sanctis, Maria Carmela Pera, Marco Piastra, Orazio Genovese, Federica Ricci, Ilaria Cavallina, Riccardo Masson, Riccardo Zanin, Caterina Agosto, Eleonora Salomon, Irene Bruno, Andrea Magnolato, Enrico Bertini, Francesco Danilo Tiziano, Francesca Bovis, Eugenio Mercuri¹, on behalf of the Italian EAP Working Group Type I spinal muscular atrophy patients treated with nusinersen: 4-year follow-up of motor, respiratory and bulbar function] *European journal of neurology* DOI: 10.1111/ene.15768

- [18] Glanzman AM, Mazzone E, Main M, et al. The Children's Hospital of Philadelphia infant test of neuromuscular disorders (CHOP INTEND): test development and reliability. *Neuromuscul Disord*. 2010;20(3):155-161.
- [19] Haataja L, Mercuri E, Regev R, et al. Optimality score for the neurologic examination of the infant at 12 and 18 months of age. *J Pediatr*. 1999;135(2 Pt 1):153-161.
- [20] O'Hagen JM, Glanzman AM, McDermott MP, et al. An expanded version of the Hammersmith functional motor scale for SMA II and III patients. *Neuromuscul Disord*. 2007;17(9-10): 693-697.
- [21] Montes J, McDermott MP, Martens WB, et al. Six-minute walk test demonstrates motor fatigue in spinal muscular atrophy. *Neurology*. 2010;74(10):833-838
- [22] Dubowitz V. Chaos in classification of the spinal muscular atrophies of childhood. *Neuromuscul Disord*. 1991;1(2):77-80.
- [23] Pane M, Coratti G, Sansone VA, et al. Type I SMA "new natural history": long-term data in nusinersen-treated patients. *Ann Clin Transl Neurol*. 2021; 8(3): 548-557.
- [24] Hagenacker T, Wurster CD, Gunther R, et al. Nusinersen in adults with 5q spinal muscular atrophy: a non-interventional, multicentre, observational cohort study. *Lancet Neurol*. 2020; 19(4): 317-325.
- [25] Pechmann A, Behrens M, Dornbrack K, et al. Effect of nusinersen on motor, respiratory and bulbar function in early-onset spinal muscular atrophy. *Brain*. 2023; 146(2): 668-677.
- [26] De Sanctis R, Coratti G, Pasternak A, et al. Developmental milestones in type I spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord* 2016; **26**: 754-59.
- [27] Ratni H, Ebeling M, Baird J, et al. Discovery of risdiplam, a selective survival of motor neuron-2 (SMN2) gene splicing modifier for the treatment of spinal muscular atrophy (SMA). *J Med Chem* 2018;61:6501-6517.
- [28] Kaufmann P, et al. Observational study of spinal muscular atrophy type I and implications for clinical trials. *Neurology* 2014;83:810-817.
- [29] Finkel RS, McDermott MP, Kaufmann P, et al. Observational study of spinal muscular atrophy type I and implications for clinical trials. *Neurology* 2014;83:810-817.
- [30] Kolb SJ, Coffey CS, Yankey JW, et al. Natural history of infantile-onset spinal muscular atrophy. *Ann Neurol* 2017;82:883-891

- [31] Chatwin, M.; Bush, A.; Simonds, A.K. Outcome of goal-directed non-invasive ventilation and mechanical insufflation/exsufflation in spinal muscular atrophy type, I. *Arch. Dis. Child.* 2011, *96*, 426–432.
- [32] Grychtol, R.; Abel, F.; Fitzgerald, D.A. The role of sleep diagnostics and non-invasive ventilation in children with spinal muscular atrophy. *Paediatr. Respir. Rev.* 2018, *28*, 18–25.
- [33] Kolb, S.J.; Coffey, C.S.; Yankey, J.W.; Krossschell, K.; Arnold, W.D.; Rutkove, S.B.; Swoboda, K.J.; Reyna, S.P.; Sakonju, A.; Darras, B.T.; et al. Natural history of infantile-onset spinal muscular atrophy. *Ann. Neurol.* 2017, *82*, 883–891
- [34] Perez, A.; Mulot, R.; Vardan, G.; Barois, A.; Gallego, J. Thoracoabdominal Pattern of Breathing in Neuromuscular Disorders. *Chest* 1996, *110*, 454–461
- [35] Mercuri, E.; Finkel, R.S.; Muntoni, F.; Wirth, B.; Montes, J.; Main, M.; Mazzone, E.S.; Vitale, M.; Snyder, B.; Quijano-Roy, S.; et al. Diagnosis and management of spinal muscular atrophy: Part 1: Recommendations for diagnosis, rehabilitation, orthopedic and nutritional care. *Neuromuscul. Disord.* 2018, *28*, 103–115.
- [36] LoMauro, A.; Aliverti, A.; Mastella, C.; Arnoldi, M.T.; Banfi, P.; Baranello, G. Spontaneous Breathing Pattern as Respiratory Functional Outcome in Children with Spinal Muscular Atrophy (SMA). *PLoS ONE* 2016, *11*, e0165818.
- [37] Day, J.W.; Finkel, R.S.; Chiriboga, C.A.; Connolly, A.M.; Crawford, T.O.; Darras, B.T.; Iannaccone, S.T.; Kuntz, N.L.; Peña, L.D.M.; Shieh, P.B.; et al. Onasemnogene abeparvovec gene therapy for symptomatic infantile-onset spinal muscular atrophy in patients with two copies of SMN2 (STRIVE): An open-label, single-arm, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Neurol.* 2021, *20*, 284–293.
- [38] Fitzgerald, D.A.; Abel, F.; Jones, K.J.; Farrar, M.A. Spinal muscular atrophy: A modifiable disease emerges. *Paediatr. Respir. Rev.* 2018, *28*, 1–2
- [39] Fitzgerald, D.A. Doumit, M.; Abel, F. Changing respiratory expectations with the new disease trajectory of nusinersen treated spinal muscular atrophy [SMA] type 1. *Paediatr. Respir. Rev.* **2018**
- [40] Al-Zaidy, S.; Pickard, A.S.; Kotha, K.; Alfano, L.N.; Lowes, L.; Paul, G.; Church, K.; Lehman, K.; Sproule, D.M.; Dabbous, O.; et al. Health outcomes in spinal muscular atrophy type 1 following AVXS-101 gene replacement therapy. *Pediatr. Pulmonol.* 2019, *54*, 179–185
- [41] LoMauro, A.A.-O.; Mastella, C.; Scoto, M.; Muntoni, F.; Chan, E.; Edel, L.; Aliverti, A.; Baranello, G. Can Breathing Pattern Assessment Predict the Need

of Ventilatory Support in Treated Infants with Spinal Muscular Atrophy Type 1? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2022, 206, 118–120

- [42] Dizdar, E.A.; Bozkaya, D.; Sari, F.N.; Beser, E.; Tayman, C.; Oguz, S.S. Tidal Breathing Parameters Measured by Structured Light Plethysmography in Newborns: Is It Feasible in Neonatal Intensive Care Unit? *Am. J. Perinatol.* 2021, 38, 1254–1258
- [43] Karthika, M.; Al Enezi, F.A.; Pillai, L.V.; Arabi, Y.M. Rapid shallow breathing index. *Ann. Thorac. Med.* 2016, 11, 167–176
- [44] Ghezzi, M.; Tenero, L.; Piazza, M.; Zaffanello, M.; Paiola, G.; Piacentini, G.L. Feasibility of structured light plethysmography for the evaluation of lung function in preschool children with asthma. *Allergy Asthma Proc.* 2018, 39, e38–e42.
- [45] Balasubramaniam, S.L.; Wang, Y.; Ryan, L.; Hossain, J.; Rahman, T.; Shaffer, T.H. Age-related ranges of respiratory inductance plethysmography (RIP) reference values for infants and children. *Paediatr. Respir. Rev.* 2019, 29, 60–67.
- [46] Kartika, M.; Al Enezi, F.A.; Pillai, L.V.; Arabi, Y.M. Rapid shallow breathing index. *Ann. Thorac. Med.* 2016, 11, 167–176
- [47] McMillan H.J., Proud C.M., Farrar M.A., Alexander I.E., Muntoni F., Servais L. Onasemnogene abeparvovec for the treatment of spinal muscular atrophy. *Expert Opin Biol Ther.* 2022;22(9):1075–1090
- [48] Mendell J.R., Al-Zaidy S.A., Lehman K.J., et al. Five-year extension results of the phase 1 START trial of onasemnogene abeparvovec in spinal muscular atrophy. *JAMA Neurol.* 2021;78(7):834–841
- [49] Mercuri E., Muntoni F., Baranello G., et al. Onasemnogene abeparvovec gene therapy for symptomatic infantile-onset spinal muscular atrophy type 1 (STRIVE-EU): an open-label, single-arm, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Neurol.* 2021;20(10):832–841
- [50] D'Silva A.M., Holland S., Kariyawasam D., et al. Onasemnogene abeparvovec in spinal muscular atrophy: an Australian experience of safety and efficacy. *Ann Clin Transl Neurol.* 2022;9(3):339–350.
- [51] Strauss K.A., Farrar M.A., Muntoni F., et al. Onasemnogene abeparvovec for presymptomatic infants with three copies of SMN2 at risk for spinal muscular atrophy: the phase III SPR1NT trial. *Nat Med.* 2022;28(7):1390–1397.

- [52] Lee S., Lee Y.J., Kong J., et al. Short-term clinical outcomes of onasemnogene abeparvovec treatment for spinal muscular atrophy. *Brain Dev.* 2022;44(4):287–293.
- [53] Mirea A., Shelby E.S., Axente M., et al. Combination therapy with nusinersen and onasemnogene abeparvovec-xioi in spinal muscular atrophy type I. *J Clin Med.* 2021;10(23):5540
- [54] Chand D., Mohr F., McMillan H., et al. Hepatotoxicity following administration of onasemnogene abeparvovec (AVXS-101) for the treatment of spinal muscular atrophy. *J Hepatol.* 2021;74(3):560–566.
- [55] Matesanz S.E., Battista V., Flickinger J., Jones J.N., Kichula E.A. Clinical experience with gene therapy in older patients with spinal muscular atrophy. *Pediatr Neurol.* 2021;118:1–5.