



Francesca Simonelli, Francesco Testa, Claudio Iovino, Paolo Melillo,  
Valentina Di Iorio, Settimio Rossi, Michele Della Corte

Eye Clinic, Multidisciplinary Department of Medical, Surgical and Dental Sciences,  
University of Campania Luigi Vanvitelli, Naples, Italy

# Cambiamenti anatomici e funzionali dopo trattamento con Voretigene Neparvovec in bambini con distrofia retinica RP65 correlata

## ABSTRACT

**Introduzione:** Le mutazioni a carico del gene RPE65 rappresentano fino al 16 % dei casi di Amaurosi Congenita di Leber e fino al 2% di Retinite Pigmentosa.

In questo articolo riportiamo la nostra esperienza sulla terapia genica sottoretinica con Voretigene Neparvovec in pazienti con distrofia retinica RPE65 correlata. In particolare, soffermandoci sui cambiamenti anatomici e funzionali indotti dal trattamento.

**Materiali e Metodi:** Studio retrospettivo che include sei pazienti pediatriche sottoposti ad esame oftalmologico completo. L'acuità visiva corretta e la tomografia a coerenza ottica (OCT) sono state eseguite al baseline e ad ogni follow-up. In particolare, sono stati analizzati gli spessori retinici con particolare riguardo allo strato nucleare esterno.

**Risultati:** L'acuità visiva corretta è migliorata significativamente ad 1 e 6 mesi ( $P < 0.001$ ). Lo spessore della retina centrale e dello strato nucleare esterno hanno mostrato un progressivo incremento ( $6.4 \pm 19.2 \mu\text{m}$ ;  $P = 0.080$  and  $3.42 \pm 7.68 \mu\text{m}$ ;  $P = 0.091$ , rispettivamente) a 6 mesi. Inoltre, un incremento statisticamente significativo dello spessore dello strato nucleare esterno è stato osservato nell'anello interno della griglia ETDRS al mese 1 ( $4.7 \pm 8.4 \mu\text{m}$ ;  $P < 0.001$ ) e 6 ( $4.7 \pm 8.4 \mu\text{m}$ ;  $P < 0.001$ ). Il distacco maculare intraoperatorio non era associato ad un maggiore vantaggio in termini di guadagno di acuità visiva, ma bensì ad una lieve riduzione dello spessore dello strato nucleare esterno.

**Conclusioni:** Il miglioramento dell'acuità visiva e l'incremento dello spessore dello strato nucleare esterno suggeriscono che il miglioramento funzionale post trattamento in pazienti con distrofia retinica RPE65 correlata, possa essere associato al parziale ripristino della morfologia foveale.

**Keywords:** Distrofie retiniche ereditarie; Voretigene Neparvovec; Terapia genica.

## Introduzione

Le distrofie retiniche ereditarie rappresentano una delle principali cause di cecità legale nell'infanzia. Si tratta di un gruppo di patologie oculari rare, eterogenee da un punto di vista clinico e

genetico, caratterizzate da una progressiva degenerazione retinica. L'amaurosi congenita di Leber ("Leber congenital amaurosis" LCA) fu descritta la prima volta da Theodore Leber nel 1869; oggi il termine si riferisce ad un gruppo

di distrofie retiniche di tipo rod-cone ad esordio precoce, severe, con un pattern di trasmissione autosomico recessivo. L'amaurosi congenita di Leber (LCA) rappresenta circa il 5% di tutte le forme di distrofie retiniche ereditarie ed ha una prevalenza di circa 1:80.000- 1: 200.000<sup>1,2</sup>.

I geni coinvolti con maggiore frequenza nella LCA sono GUCY2D, CEP290, CRB1, RDH12 e RPE65, con una discreta variabilità a seconda delle diverse coorti studiate<sup>3</sup>.

I pazienti affetti da LCA manifestano entro i primi mesi di vita nistagmo, riflessi pupillari torpidi o pupille amaurotiche, il segno oculo-digitale di Franceschetti (che consiste nel premere sull'occhio con le dita, probabilmente per stimolare i fotorecettori disfunzionali inducendo dei fosfeni) nelle forme più severe.

L'esame del fondo oculare può risultare normale inizialmente o possono essere riscontrati quadri oftalmoscopici di diversa severità, con caratteristiche simili alla Retinite Pigmentosa (RP) con pallore del disco ottico, attenuazione della trama vascolare, presenza di pigmento tipico ed atipico in media periferia e più raramente un coinvolgimento maculare<sup>3</sup>.

solitamente non è registrabile, che di quella fotopica. Anche per quanto riguarda l'esame all'autofluorescenza possiamo avere quadri diversi a seconda del gene coinvolto; infatti, nei pazienti con fenotipi meno severi è ancora possibile identificare l'autofluorescenza retinica.

RPE65 è uno dei primi geni espressi nell'epitelio pigmentato retinico (EPR) ad essere stato associato alle distrofie retiniche ereditarie<sup>4</sup>.

Mutazioni bi-alleleliche a carico di questo gene sono responsabili di quadri fenotipici diversi tra loro. In particolare, si è visto che nel 66% dei casi esse si associano ad un fenotipo di LCA2 e nel 16% ad un fenotipo di RP (RP20)<sup>5</sup>.

Il gene RPE65, si trova sul cromosoma 1, locus 1p31.2, e contiene 14 esoni codificanti. In particolare, converte gli all-trans-retinil-esteri in 11-cis-retinolo permettendo la rigenerazione dell'11-cis retinale e quindi del cromoforo della rodopsina a seguito di un evento di fotoisomerizzazione<sup>4</sup>.

Una mutazione in RPE65 che causa un deficit dell'enzima comporta una ridotta disponibilità di 11 cis-retinale, un accumulo progressivo di granuli di pigmento nell'EPR e una progressiva

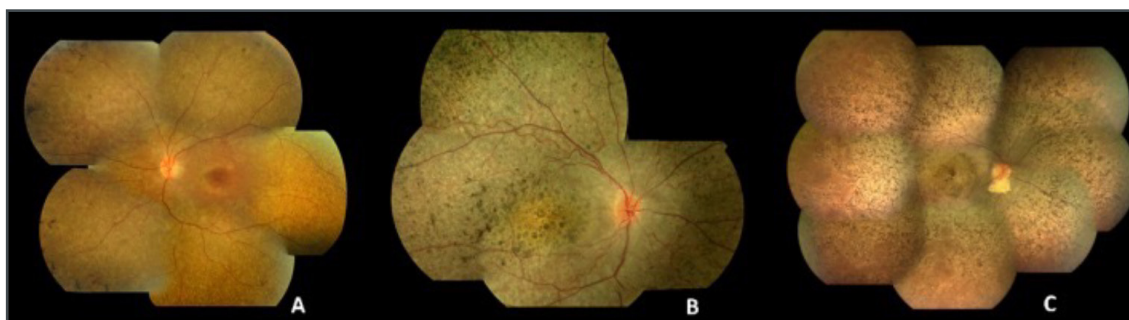


Figura 1 - A, B, C Diversi esempi di quadri oftalmoscopici in pazienti con LCA

Gli esami strumentali utilizzati per la diagnosi sono rappresentati da: campo visivo Goldmann, elettroretinogramma, tomografia a coerenza ottica (OCT) ed autofluorescenza. Inoltre, l'elettroretinogramma mostra una severa compromissione sia della componente scotopica, che

degenerazione retinica, inizialmente a carico dei bastoncelli, dal momento che i coni sembrano avere un ciclo dei retinoidi alternativo che non dipende da RPE65<sup>5</sup>.

La terapia genica rappresenta un nuovo approccio terapeutico per le malattie causate da una

mutazione genetica nota, in cui il principio attivo è rappresentato dalla sequenza nucleotidica di un acido nucleico.

Per le patologie a carico dell'EPR o dei fotorecettori la somministrazione sottoretinica di un vettore risulta quella più efficace, in quanto permette una più accurata localizzazione delle cellule target e una minore quantità di farmaco richiesto, sebbene sono presenti dei rischi legati all'atto chirurgico (possibile sviluppo di foro maculare, distacco di retina, glaucoma, cataratta, endoftalmitide, rotture retiniche)<sup>6,7</sup>.

Alla luce dei risultati ottenuti dallo studio di fase III, il 21 Ottobre 2017 il farmaco "Voretigene Neparvovec-rzyl" è stato approvato negli USA dalla Food and Drug Administration (FDA) per il trattamento dei pazienti con diagnosi di distrofia retinica ereditaria dovuta a mutazioni del gene RPE65 e commercializzato con il nome di Luxturna™.

Nel Settembre 2018, l'EMA (Agenzia Europea per i Medicinali) ha dato la concessione per l'immissione in commercio di Luxturna™ negli Stati dell'Unione Europea. Nel Novembre del 2019, la Clinica Oculistica dell'AOU dell'Università degli Studi della Campania Luigi Vanvitelli, è stata il primo centro in Italia ad essere certificato per la somministrazione di Luxturna™.

Qui di seguito riportiamo la nostra esperienza sulla terapia genica sottoretinica con Voretigene Neparvovec in pazienti con distrofia retinica RPE65 correlata, soffermandoci in particolare sui cambiamenti anatomici e funzionali indotti dal trattamento.

### **Materiali e Metodi**

In questo studio retrospettivo abbiamo incluso tutti i pazienti con mutazione RPE65 trattati con Voretigene Neparvovec presso il Centro di Patologie Rare dell'Università della Campania Luigi Vanvitelli, Napoli. Tutti i pazienti e/o i

loro tutori legali hanno dato il loro consenso per partecipare allo studio post-approvazione e tutte le procedure erano conformi ai postulati della dichiarazione di Helsinki. Solo i pazienti che soddisfavano i criteri di trattamento con Voretigene Neparvovec (ad esempio spessore retinico >100 µm) e capaci di avere una fissazione stabile all'OCT sono stati inclusi. Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad esame dell'acuità visiva corretta ed esame OCT volumetrico (dense 20°x15°) per l'analisi degli spessori retinici al baseline, ad 30/45 giorni e a 6 mesi. In particolare, dalle scansioni volumetriche sono stati calcolati gli spessori retinici totali e dei singoli strati, incluso lo strato nucleare esterno. Inoltre, l'integrità della banda ellissoide e della membrana limitante esterna in sede foveale è stata valutata.

Un solo chirurgo (MDC) ha eseguito tutti i trattamenti attraverso una vitrectomia 25 G, con distacco posteriore del vitreo dopo staining con triamcinolone, seguito da iniezione sottoretinica di Voretigene Neparvovec mediante cannula da 25/38 gauge OCT guidata. In tutti i pazienti l'occhio che vedeva meno è stato operato prima e dopo 15 giorni circa l'occhio adelfo.

### **Risultati**

Un totale di 6 pazienti pediatrici (12 occhi) con una età media di  $10.2 \pm 3.1$  anni (range 7-17 anni) sono stati arruolati. L'acuità visiva corretta al baseline era 50 L ETDRS, con un incremento di + 8 L a 30/45 giorni ( $P < 0.001$ ), mentre a 6 mesi 6 occhi hanno mostrato un miglioramento di una linea ETDRS e 6 occhi di 2 linee ETDRS ( $P < 0.001$ ).

L'analisi qualitativa degli strati retinici al baseline con SD-OCT ha mostrato alterazioni della banda ellissoide in 11 occhi su 12, e della membrana limitante esterna in 10 occhi su 12.

L'analisi dello spessore retinico centrale è ap-

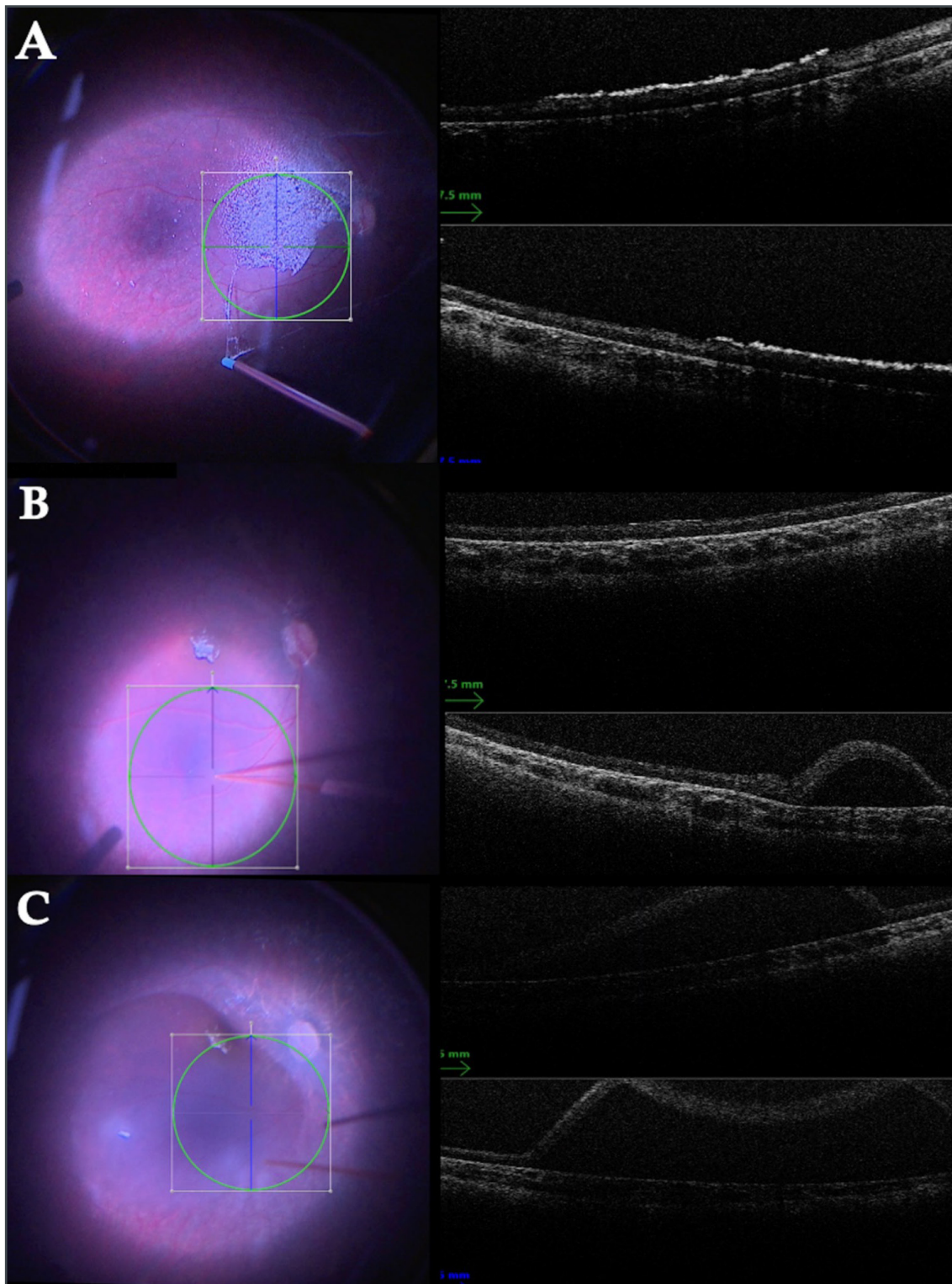


Figura 2 - A-C Fasi chirurgiche della vitrectomia 25 G con somministrazione sottoretinica di Voretigene Neparvec. A Induzione del distacco posteriore di vitreo. B e C Iniezione sottoretinica di Voretigene Neparvec mediante cannula 25/38 G che induce un distacco maculare.

parso ridotto ( $225.9 \pm 28.2 \mu\text{m}$ ) se paragonato ad occhi sani ( $266.3 \pm 11.0 \mu\text{m}$ ). Al mese 6 abbiamo osservato un progressivo

incremento dello spessore retinico foveale ( $6.4 \pm 19.2 \mu\text{m}$ ;  $P=0.080$ ) e dello spessore dello strato nucleare esterno ( $3.42 \pm 7.68 \mu\text{m}$ ;  $P=0.091$ ).

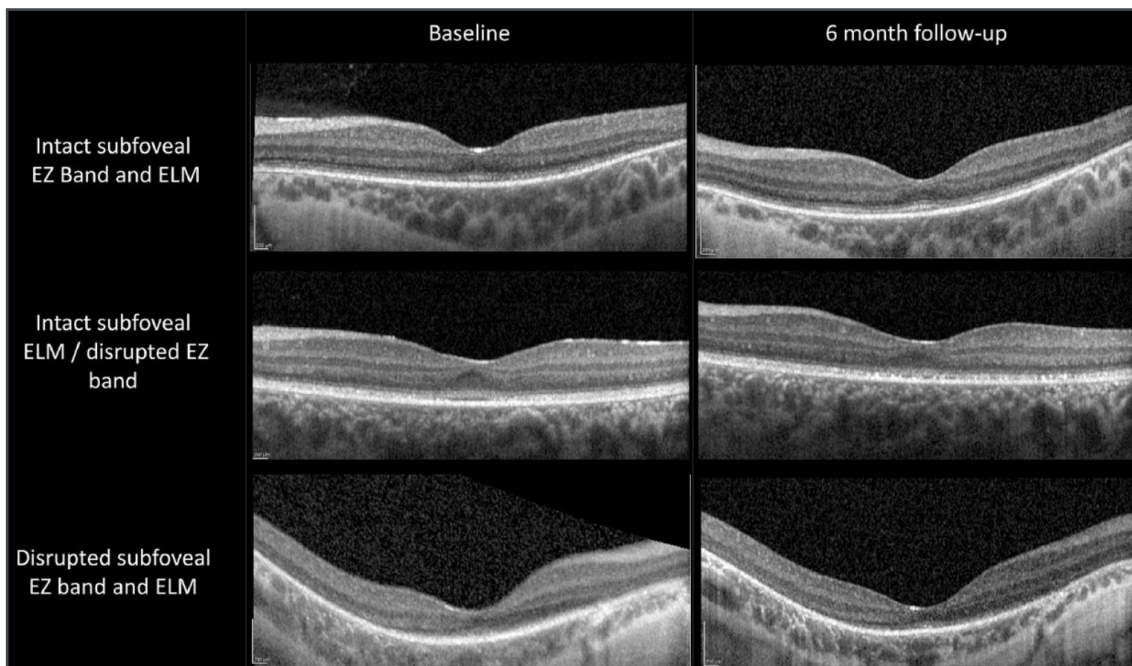


Figura 3 - Scansioni SD-OCT al baseline e al mese 6 in tre casi selezionati che mostrano l'essenza di cambiamenti all'analisi qualitativa dopo trattamento con Voretigene Neparvec.

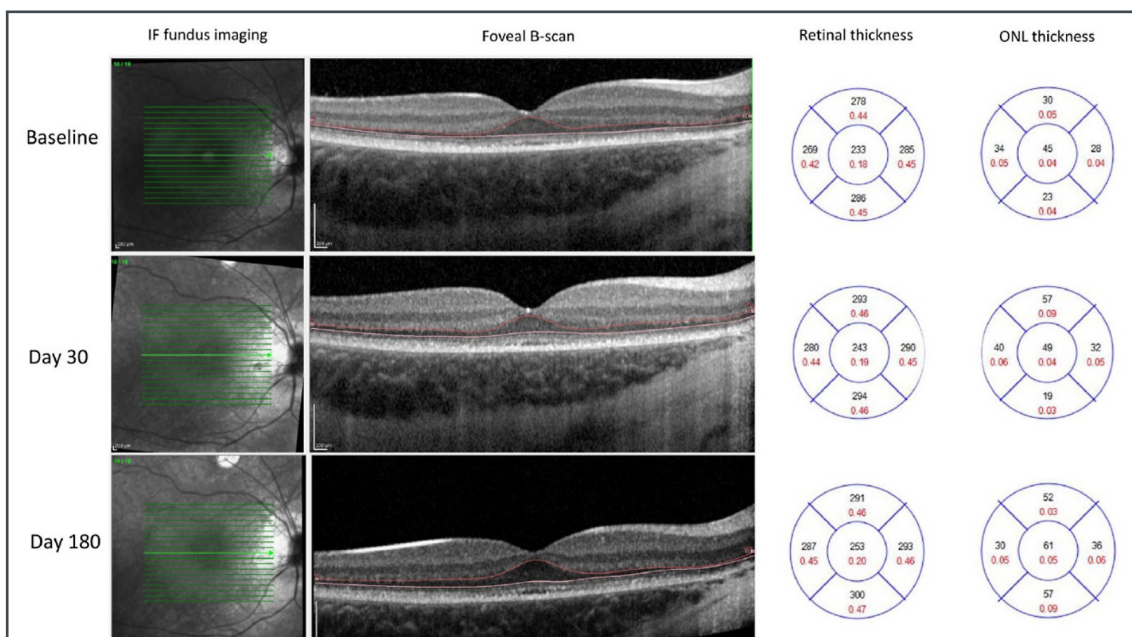


Figura 4 - Scansioni SD-OCT di un occhio trattato con Voretigene Neparvec, che mostra l'incremento di spessore dello strato nucleare esterno dal baseline al mese 1 e al mese 6 rispettivamente.

Inoltre, un incremento statisticamente significativo dello spessore dello strato nucleare esterno è stato osservato nell'anello interno della griglia ETDRS al giorno 30/45 ( $4.7 \pm 8.4 \mu\text{m}$ ;  $P < 0.001$ ) e a 6 mesi ( $5.0 \pm 5.7 \mu\text{m}$ ;  $P < 0.009$ ). Infine, analizzando la relazione tra il guadagno

visivo e il cambiamento di spessore dello strato nucleare esterno, abbiamo osservato che un maggiore miglioramento dell'acuità visiva era associato ad un maggiore incremento dello spessore dello strato nucleare esterno nell'anello interno della griglia ETDRS.

## Conclusioni

In questo studio abbiamo analizzato i cambiamenti anatomici e funzionali in pazienti con distrofia retinica RPE65 correlata sottoposti a trattamento con Voretigene Neparvovec. I miglioramenti dell'acuità visiva in seguito alla terapia erano già stati descritti nei reports dei clinical trials<sup>6,7</sup>, e in alcuni casi di real life<sup>8</sup>. I risultati del nostro studio in termini di acuità visiva sono in linea con quelli riportati in letteratura, tuttavia i cambiamenti retinici ed in particolare lo spessore dello strato nucleare esterno rappresentano un aspetto mai investigato prima. In particolare, l'analisi di questo strato retinico che contiene i nuclei dei coni e bastoncelli potrebbe essere più rappresentativa degli effetti della terapia genica sulla funzionalità dei fotorecettori rispetto all'analisi dello spessore retinico totale. In accordo con la letteratura esistente non abbiamo osservato cambiamenti significativi nell'analisi qualitativa della banda ellissoide e della membrana limitante esterna dopo trattamento. I risultati del nostro studio suggeriscono che il trattamento con Voretigene Neparvovec riduce

la degenerazione dei fotorecettori, con un parziale ripristino della morfologia foveale, soprattutto tra 1 e 3 mm intorno alla fovea, corrispondente ai 3.5°-7°, dove i coni e i bastoncelli sono entrambi rappresentati. Questi cambiamenti retinici corrispondono inoltre ad un miglioramento significativo della acuità visiva.

Infine, abbiamo analizzato l'impatto del distacco di macula intraoperatorio indotto dall'iniezione sottoretinica sull'acuità visiva e sulla morfologia retinica.

Non abbiamo trovato alcuna influenza del distacco maculare sul miglioramento visivo. Tuttavia, gli occhi dove si verificava il distacco maculare presentavano una lieve riduzione dello spessore dello strato nucleare esterno (non statisticamente significativa). Relativamente ai limiti dello studio, sebbene il numero di pazienti incluso sia esiguo, le analisi OCT che abbiamo eseguito necessitano di una buona fissazione e pertanto abbiamo escluso tutti i pazienti con nistagmo.

Ulteriori studi con numeri maggiori e follow-up più lunghi saranno utili nel confermare ulteriormente i nostri findings.

## REFERENCES

1. E. M. Stone, "Leber Congenital Amaurosis—A Model for Efficient Genetic Testing of Heterogeneous Disorders: LXIV Edward Jackson Memorial Lecture," *Am J Ophthalmol*, vol. 144, no. 6, pp. 791-811.e6, Dec. 2007, doi: 10.1016/j.ajo.2007.08.022.
2. R. K. Koenekoop, "An overview of leber congenital amaurosis: a model to understand human retinal development," *Surv Ophthalmol*, vol. 49, no. 4, pp. 379-398, Jul. 2004, doi: 10.1016/j.survophthal.2004.04.003.
3. A. I. den Hollander, R. Roepman, R. K. Koenekoop, and F. P. M. Cremers, "Leber congenital amaurosis: Genes, proteins and disease mechanisms," *Prog Retin Eye Res*, vol. 27, no. 4, pp. 391-419, Jul. 2008, doi: 10.1016/j.preteyeres.2008.05.003.
4. F. Marlhens et al., "Mutations in RPE65 cause Leber's congenital amaurosis," *Nat Genet*, vol. 17, no. 2, pp. 139-141, Oct. 1997, doi: 10.1038/ng1097-139.
5. S. Gu et al., "Mutations in RPE65 cause autosomal recessive childhood-onset severe retinal dystrophy," *Nat Genet*, vol. 17, no. 2, pp. 194-197, Oct. 1997, doi: 10.1038/ng1097-194.
6. F. Simonelli et al., "Gene Therapy for Leber's Congenital Amaurosis is Safe and Effective Through 1.5 Years After Vector Administration," *Molecular Therapy*, vol. 18, no. 3, pp. 643-650, Mar. 2010, doi: 10.1038/mt.2009.277.
7. A. M. Maguire et al., "Safety and Efficacy of Gene Transfer for Leber's Congenital Amaurosis," *New England Journal of Medicine*, vol. 358, no. 21, pp. 2240-2248, May 2008, doi: 10.1056/NEJMoa0802315.
8. Sengillo, J. D. et al. Visual acuity, retinal morphology, and patients' perceptions after voretigene neparvovec-rzyl for RPE65-associated retinal disease. *Ophthalmol. Retina*, April 2022.