

Nuove prospettive terapeutiche per le malattie lisosomiali: terapia enzimatica sostitutiva, terapia con piccole molecole, terapia cellulare e terapia genica

New therapeutic options for lysosomal storage disorders: enzyme replacement, small molecules, cell therapy and gene therapy

M. DI ROCCO, D. BUZZI

II Pediatria, Istituto "G. Gaslini", Genova

Parole chiave. — Terapia enzimatica sostitutiva - Inibitori del substrato - Chaperonine - Trapianto di cellule ematopoietiche - Terapia genica

Key words. — *Enzyme replacement therapy - Substrate inhibitor - Chaperone drugs - Haematopoietic cell transplantation - Gene therapy*

Articolo speciale per invito
Invited special article

Summary

During the last few years, much progress has been made in the treatment of lysosomal storage disorders. In the past, no specific therapy was available for the affected patients, and management consisted solely of supportive care and treatment of complications. Since enzyme replacement therapy has been successfully introduced for patients with Gaucher disease, this principle of treatment has been taken into consideration for other lysosomal storage disorders as well. Enzyme replacement therapy is now available also for Fabry disease, mucopolysaccharidoses type I, II and VI and glycogenosis II. However, the usefulness of enzyme replacement therapy is limited due to the fact that a given enzyme preparation does not cross blood-brain barrier. A further novel therapeutic option for lysosomal storage disorders consists of the application of small

molecules that either inhibit a key enzyme which is responsible for substrate synthesis (substrate deprivation) or act as a chaperone to increase the residual activity of the lysosomal enzyme (enzyme enhancing therapy). These small molecules cross blood brain barrier. Haematopoietic cell transplantation has been successfully applied as curative treatment in a series of lysosomal storage disease. Best results are obtained when performed early in the course of the disease. Donor cell cross blood-brain barrier, therefore this therapeutical option is available also for lysosomal diseases with central nervous system involvement. Other treatment strategies currently under consideration are gene therapy and stem cell therapy. This review will give an insight into these newly developed therapeutic strategies and will discuss their advantages and limitations.

Introduzione

Nonostante le malattie lisosomiali siano state caratterizzate clinicamente e biochimicamente da diversi decenni, per lungo tempo nessuna terapia specifica è stata possibile ed il trattamento dei pazienti è stato limitato alla sola terapia supportiva.

Negli ultimi anni il numero di opzioni terapeutiche per le malattie lisosomiali è incrementato in maniera significativa, tuttavia rimane problematico il trattamento delle forme in cui esiste una compromissione del sistema nervoso centrale per la difficoltà di superare la barriera ematoencefalica²⁰. Infatti il 98% delle piccole molecole e la quasi totalità delle grandi molecole con azione farmacologica non sono in grado di superare la barriera ematoencefalica. Escludendo la possibilità di permeabilizzare la barriera con solventi, agenti alchilanti, sostanze vasoattive, le uniche possibilità di attraversarla sono la somministrazione transcranica, comunque molto invasiva, quella transnasale o transoculare, non sempre efficace, e quella transvascolare mediante trasportatori endogeni, ancora in fase di sperimentazione.

Un secondo problema, che interferisce con l'identificazione di una terapia efficace, è l'imperfetta conoscenza dei meccanismi patogenetici del danno neurologico. Infatti l'accumulo di substrato è solo il fattore d'innescò di una catena di eventi talora irreversibili. Tra questi assumono un'importanza di un qualche rilievo l'infiammazione che consegue alla liberazione di citochine da parte della cellula in cui si verifica l'accumulo di substrato, l'alterazione dell'omeostasi del calcio, lo "stress" del sistema reticolo endoteliale legato allo smaltimento di proteine con struttura alterata (*Unfolded Protein Response* – UPR), l'alterazione secondaria dei lipidi cellulari^{11-13 19 25 29}. A valle di tutti questi eventi si determinano l'apoptosi neuronale e l'alterazione della crescita neuronale. Nella Figura 1 sono schematizzati i meccanismi patogenetici a tutt'oggi conosciuti del danno del sistema nervoso centrale.

Terapia enzimatica sostitutiva

La terapia enzimatica sostitutiva (*Enzyme Replacement Therapy* – ERT) è possibile da più di 10 anni per la malattia di Gaucher e a tutt'oggi i pazienti trattati in tutto il mondo sono circa 4.800. Da qualche anno l'ERT è anche disponibile per la malattia di Fabry, le mucopolisaccaridosi I, II e VI, la glicogenosi II².

Il principio su cui si basa è il fatto che l'enzima, sintetizzato in vitro con le tecniche del DNA ricombinante e somministrato endovena, viene riconosciuto dai recettori cellulari e internalizzato nei lisosomi, dove è in grado di degradare i substrati accumulati.

L'efficacia della terapia enzimatica varia da organo ad organo e dipende dal grado di compromissione: se il danno funzionale è già molto avanzato al momento dell'inizio dell'ERT, la condizione può essere irreversibile. Inoltre attualmente l'ERT è inefficace nell'arrestare il deterioramento neurologico poiché l'enzima somministrato endovena non è in grado di superare la barriera ematoencefalica.

In modelli animali di diverse malattie lisosomiali l'iniezione endovenosa dell'enzima sembra in grado di ridurre l'accumulo cerebrale del substrato^{22 26 30}. Tuttavia questo non trova conferma nella pratica clinica: l'ERT non è in grado d'arrestare il deterioramento neurologico nella malattia di Gaucher tipo II e tipo III e anche la somministrazione di alte dosi di enzima o la somministrazione intratecale risulta inefficace sulla malattia del sistema nervoso centrale.

Nella malattia di Fabry non è sicuramente dimostrato che l'ERT sia efficace nel prevenire la complicità neurologica, costituita dalla patologia vascolare cerebrale.

Per le mucopolisaccaridosi I e II i *trial* clinici pre-registrazione hanno documentato l'efficacia dell'ERT per i soli sintomi sistemici: non esiste quindi attualmente l'indicazione a questa terapia nelle forme in cui esiste la compromissione del SNC.

L'obiettivo futuro è quello di modificare biochimicamente l'enzima in modo da permetterne il riconoscimento da parte di un qualche sistema di trasporto attraverso la barriera emato-encefalica²⁸.

Un problema a sé è invece quello dell'ERT nella glicogenosi II.

L'ERT è estremamente efficace nel determinare la regressione della patologia cardiaca nelle forme infantili, mentre la risposta non è altrettanto positiva relativamente al muscolo. Questo accade poiché il difetto enzimatico ed il conseguente accumulo di glicogeno inducono una generalizzata disfunzione dell'endocitosi e dell'autofagia nel muscolo (in particolare nelle fibre tipo II), che è la causa della distruzione dello stesso e della mancata azione dell'ERT¹⁰.

Terapia con inibitore di substrato

La terapia con inibitore di substrato è basata sul presupposto che il blocco della via metabolica a monte del difetto possa limitare l'accumulo di substrato⁶.

Il Miglustat, un iminozucchero, inizialmente ipotizzato come farmaco per l'AIDS, si è rivelato capace di inibire l'enzima glucocerebrosidasi sintasi e quindi di prevenire la sintesi di glucocerebrosidi e di altri sfingolipidi. Il farmaco, che viene somministrato per via orale, è stato registrato per la malattia di Gaucher in cui la carenza di glucocerebrosidasi determina appunto l'accumulo di glucocerebrosidi. Tenuto conto del fatto che il Miglustat è una piccola molecola in grado di superare la barriera emato-encefalica l'ovvia proposta terapeutica ha inizialmente riguardato i pazienti con malattia di Gaucher cronica, neuronopatica (Gaucher tipo III); tuttavia in un *trial* clinico controllato il Miglustat non ha determinato alcuna variazione del decorso della malattia neurologica nei pazienti affetti da questa forma di malattia di Gaucher.

Per quanto riguarda il Miglustat, è stato proposto l'utilizzo anche in altre malattie metaboliche con compromissione del sistema nervoso in cui si accumulano sfingolipidi, ma i dati attualmente disponibili sono limitati.

La somministrazione di Miglustat nella malattia di Tay-Sachs non ha modificato significativamente il decorso di malattia³. Sono invece ancora in corso trials clinici atti a verificare l'efficacia del Miglustat nella gangliosidosi GM1 ad esordio tardivo e nella malattia di Niemann-Pick tipo C, per cui esistono dati relativi alla risposta in modelli animali²¹.

Terapia con molecole "chaperone"

La terapia con molecole "chaperone" rappresenta un modello interessante di terapia con piccole molecole in grado di passare la barriera emato-encefalica⁷.

Alcune mutazioni determinano la sintesi di una proteina "*misfolded*" cioè di una proteina non correttamente orientata spazialmente.

Il destino delle proteine *misfolded* è quello dell'aggregazione e della precipitazione (come avviene la malattia di Parkinson relativamente all'alfa-sinucleina o nella malattia di Creutzfeldt Jakob relativamente ai prioni) oppure quello di una degradazione accelerata (come avviene per alcune mutazioni del gene della glucocerebrosidasi responsabili della malattia di Gaucher, per alcune mutazioni del gene dell'alfa-galattosidasi responsabili della malattia di Fabry, per alcune mutazioni del gene della maltasi acida, responsabili della glicogenosi II e per alcune mutazioni del gene della beta-galattosidasi responsabili della gangliosidosi GM1).

Le chaperonine chimiche sono in grado di stabilizzare le proteine enzimatiche *misfolded*, prevenendone la degradazione precoce e localizzandole correttamente nei lisosomi dove possono svolgere la loro attività funzionale.

Sono in corso *trial* clinici pre-registrativi per chaperonine attive in alcune mutazioni di malattia di Gaucher, malattia di Fabry e glicogenosi II. Ovviamente questa terapia riguarda mutazioni specifiche che determinano proteine *misfolded*: se le mutazioni comportano la mancata sintesi dell'enzima questo trattamento non è efficace.

Trapianto di cellule ematopoietiche staminali

Il trapianto di cellule ematopoietiche staminali è stato proposto nelle malattie metaboliche neurodegenerative già da alcuni decenni. Il presupposto su cui è basato è il fatto che cellule ematopoietiche del donatore sono in grado di superare la barriera ematoencefalica e differenziarsi come cellule microgliali, costituendo una fonte d'enzima al livello del sistema nervoso centrale tale da ridurre l'accumulo di substrato e prevenire ulteriori accumuli.

Questa terapia ha una qualche efficacia nelle forme ad esordio tardivo e con un decorso relativamente lento, poiché le cellule del donatore impiegano alcuni mesi a passare la barriera e nel frattempo il deterioramento neurologico non è arrestato. Inoltre, una volta definita la diagnosi, la rapidità con cui si procede al trapianto è uno dei fattori che determineranno la buona riuscita dello stesso.

La necessità di procedere nei tempi più brevi possibili al trapianto è peraltro talora interferita dalla mancanza di un donatore familiare compatibile e dai tempi tecnici imposti dalla ricerca di un donatore non familiare.

Va infine tenuto conto del fatto che questa procedura terapeutica è relativamente aggressiva e non immune da rischi per il paziente.

Sulla base dell'esperienza clinica relativa agli ultimi vent'anni sono state definite delle Linee Guida relativamente alle indicazioni e alle controindicazioni al trapianto nelle malattie lisosomiali²³.

Esiste indicazione al trapianto nella mucopolisaccaridosi I (malattia di Hurler), purché effettuato entro i 18 mesi di vita; non c'è invece indicazione per la MPSII, in cui, anche se il trapianto è effettuato precocemente, non si è in grado di evitare il deterioramento neurologico.

Non c'è indicazione per la MPS III (tutti i 4 difetti enzimatici), né per la MPS VII.

Anche mucopolisaccaridosi II, gangliosidosi GM1 e GM2, malattia di Farber, malattia di Gaucher tipo II e III, malattia di Niemann Pick tipo A e C non hanno indicazioni al trapianto.

Mannosidosi e fucosidosi hanno indicazioni al trapianto se il paziente è in fase presintomatica o ha solo modesta compromissione neurologica.

Per le forme di malattia di Krabbe ad esordio tardivo e con deterioramento neurologico limitato, così come per la leucodistrofia metacromatica ad esordio tardivo (giovanile o adulto) esiste l'indicazione al trapianto.

Per le altre malattie lisosomiali che compromettono il sistema nervoso centrale non sono disponibili dati relativi all'uomo.

I risultati del trapianto di cellule ematopoietiche per malattie metaboliche in Europa sono stati riportati da Rovelli e Steward nel 2005: a quella data risultavano trapiantati 468 pazienti, 174 dei quali con mucopolisaccaridosi I, 85 con adrenoleucodistrofia e 75 con sfingolipidosi (35 con leucodistrofia metacromatica)²⁷.

Terapia cellulare

Si basa sulla possibilità di una somministrazione diretta di cellule nel sistema nervoso per correggere il difetto metabolico⁸.

Il trapianto di cellule progenitrici di oligodendrociti è stato proposto per i difetti lisosomiali che determinano un'alterazione della mielina, mentre il trapianto di cellule staminali neuronali è stato preso in considerazione per altre malattie lisosomiali¹⁶.

La leucodistrofia metacromatica è stata la malattia lisosomiale oggetto del più grande interesse negli ultimi anni relativamente alla terapia cellulare nei modelli animali^{15 17}.

Quanto all'uomo, sono in corso *trials* clinici in diverse malattie lisosomiali (Batten disease, leucodistrofia metacromatica, gangliosidosi GM1, malattia di Tay-Sachs, malattia di Gaucher), di cui non sono noti per ora i risultati. Va comunque tenuto conto che la terapia cellulare non è esente da effetti collaterali che vanno dalla trasmissione di infezioni virali, alle reazioni anafilattiche, alla secondaria compromissione del sistema immunitario, fino al decesso del paziente¹⁴. L'entusiasmo suscitato da questa possibilità terapeutica negli ultimi anni dovrà quindi essere temperato dai risultati dei *trials* clinici.

La terapia genica

Da più di 15 anni la terapia genica è causa di illusioni e disillusioni: dal 1989 al gennaio 2007 sono stati attivati 1.283 *trials* clinici e arruolati migliaia di pazienti. Tuttavia, nonostante grandi dispendi di energie intellettuali e di finanziamenti solo il 2,3% dei *trials* è arrivato in fase III e di tutti i *trials* clinici attivati solo l'8,4% ha riguardato malattie monogeniche³¹.

Senza entrare in merito al problema dell'efficienza e della tossicità dei diversi tipo di vettori virali e non virali, della specificità del gene da trasferire e della persistenza dell'espressione del gene stesso, uno dei problemi da risolvere nelle malattie del sistema nervoso centrale è ancora una volta come superare la barriera ematoencefalica⁶. La somministrazione *in vivo* sistemica (per via intrarteriosa o intravenosa) è inefficace; la somministrazione *in vivo* locale è mol-

to invasiva: infatti nonostante siano state tentate le vie di risalita neuronale (per esempio per via endonasale utilizzando il nervo olfattivo o intraoculare utilizzando il nervo ottico), la via più efficace è comunque al momento attuale la somministrazione intracranica.

Basandosi sul fatto che le cellule ematopoietiche sono in grado di superare la barriera ematoencefalica sono stati anche avviati tentativi di trasferimento genico *ex-vivo*, modificando *in vitro* cellule ematopoietiche, che vengono poi reinfuse nel paziente^{1 24}.

Il trapianto di cellule ematopoietiche geneticamente modificate che iperesprimono l'arilsulfatasi A si è dimostrato efficace in un modello animale di leucodistrofia metacromatica nel ridurre l'accumulo di solfatidi nell'encefalo⁴.

La terapia genica è stata effettuata anche in diversi modelli animali di malattia lisosomiale, ma non sono disponibili risultati significativi nell'uomo^{5 9}.

Considerazioni conclusive

La possibilità di approcci terapeutici diversi, basati su differenti meccanismi d'azione terapeutica, sta delineando nuovi scenari per il trattamento delle malattie lisosomiali. In particolare la possibilità modificare *in vitro* gli enzimi in modo da permettere il passaggio attraverso la barriera emato-encefalica e l'utilizzo di piccole molecole con azione di inibitori del substrato e di chaperonine che passano la barriera ematoencefalica potrebbero cambiare radicalmente la storia naturale di queste malattie. Altre prospettive terapeutiche quali la terapia genica e quella cellulare, seppure a tempi più lunghi, potrebbero rappresentare un'ulteriore possibilità di trattamento delle malattie lisosomiali che compromettono il sistema nervoso centrale.

Riassunto

Negli ultimi anni il numero di opzioni terapeutiche per le malattie lisosomiali è incrementato in maniera significativa. Dal momento in cui la terapia enzimatica sostitutiva si è resa disponibile per la malattia di Gaucher, questo tipo di strategia terapeutica è stato preso in considerazione anche per altre malattie lisosomiali. Attualmente la terapia enzimatica sostitutiva è disponibile anche per la malattia di Fabry, le mucopolisaccaridosi I, II, VI e la glicogenosi II. Un limite della terapia enzimatica sostitutiva è il fatto che l'enzima non supera la barriera emato-encefalica ed è quindi inefficace nelle malattie lisosomiali in cui è compromesso il sistema nervoso centrale. Una nuova opzione terapeutica è costituita dalle piccole molecole, che agiscono come inibitori di enzimi responsabili della sintesi del substrato o come chaperonine che aumentano l'attività residua dell'enzima. Queste piccole molecole passano la barriera ematoencefalica e

quindi si prospettano come possibili terapie per le forme neurologiche. Il trapianto di cellule ematopoietiche staminali (trapianto di midollo osseo) è da molti anni utilizzato per trattare le malattie lisosomiali; dal momento che le cellule del donatore superano la barriera ematoencefalica questa terapia è utile anche per le forme che presentano compromissione del sistema nervoso centrale, sempre che il trapianto sia effettuato precocemente. Strategie terapeutiche ancora in fase sperimentale sono la terapia genica e la terapia con cellule staminali. In questo lavoro vengono considerate le varie strategie terapeutiche e sono discussi vantaggi e limitazioni delle stesse.

Bibliografia

- ¹ Asheuer M, Pflumio F, Benhamida S, et al. *Human CD34 differentiate into microglia and express recombinant therapeutic protein*. Proc Natl Acad Sci USA 2004;101:3557-62.
- ² Brady RO. *Enzyme replacement for lysosomal diseases*. Ann Rev Med 2006;57:283-96.
- ³ Bembi B, Marchetti F, Guerci VI, et al. *Substrate reduction therapy in the infantile form of Tay-Sachs disease*. Neurology 2006;66:278-80.
- ⁴ Biffi A, Capotondo A, Fasano S, et al. *Gene therapy of metachromatic leukodystrophy reverses neurological damage and deficit in mice*. J Clin Invest 2006;116:3070-82.
- ⁵ Cachon-Gonzalez MB, Wang SZ, Lynch A, Ziegler R, Cheng SH, Cox TM. *Effective gene therapy in an authentic model of Tay-Sachs-related diseases*. Proc Natl Acad Sci USA 2006;103:10373-8.
- ⁶ Cox TM. *Substrate reduction therapy for lysosomal storage diseases*. Acta Paediatr 2005;94(Suppl):69-75.
- ⁷ Desnick RJ, Schuchman EH. *Enzyme replacement and enhancement therapies: lessons from lysosomal disorders*. Nat Rev Genet 2002;3:954-66.
- ⁸ Eto Y, Shen JS, Meng XL, Ohashi T. *Treatment of lysosomal storage disorders: cell therapy and gene therapy*. J Inherit Metab Dis 2004;27:411-5.
- ⁹ Fu H, Kang L, Jennings JS, et al. *Significantly increased lifespan and improved behavioral performances by rAAV gene delivery in adult mucopolysaccharidosis IIIB mice*. Gene Ther 2007;14:1065-77
- ¹⁰ Fukuda T, Ewan L, Bauer M, et al. *Dysfunction of endocytic and autophagic pathways in a lysosomal storage disease*. Ann Neurol 2006;59:700-8.
- ¹¹ Futerman AH, van Meer G. *The cell biology of lysosomal storage disorders*. Nat Rev Mol Cell Biol 2004;5:554-65.
- ¹² Ginzburg G, Futerman AH. *Defective calcium homeostasis in the cerebellum in a mouse model of Niemann-Pick. A disease*. J Neurochem 2005;95:1619-28.
- ¹³ Ginzburg L, Kacher Y, Futerman AH. *The pathogenesis of glycosphingolipid storage disorders*. Semin Cell Dev Biol 2004;15:417-31.
- ¹⁴ Giordano A, Galderisi U, Marino IR. *From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells*. J Cell Physiol 2007;211:27-35.
- ¹⁵ Givogri MI, Galbiati S, Fasano S. *Oligodendroglial progenitor cell therapy limits central neurological deficits in mice with metachromatic leukodystrophy*. J Neurosci 2006;26:3109-19.
- ¹⁶ Goldman SA. *Stem and progenitor cell-based therapy of the human central nervous system*. Nat Biotechnol 2005;23:862-71.
- ¹⁷ Klein D, Schamandt T. *Muth-Kohene Embryonic stem cell based reduction of central nervous system sulfatide storage in an animal model of metachromatic leukodystrophy*. Gen Ther 2006;13:1686-95.
- ¹⁸ Hodges BL, Cheng SH. *Cell and gene-based therapies for the lysosomal storage diseases*. Curr Gene Ther 2006;6:227-41.
- ¹⁹ Jeyakumar M, Thomas R, Elliot-Smith E. *Central nervous system inflammation is a hallmark of pathogenesis in mouse models of GM1 and GM2 gangliosidosis*. Brain 2003;126:974-87.

- 20 Jeyakumar M, Dwek RA, Butters TD, Platt FM. *Storage solutions: treating lysosomal disorders of the brain*. *Nat Rev Neurosci* 2005;6:713-25.
- 21 Lachmann RH, Vruchte D, Lloyd-Evans E. *Treatment with miglustat reverses the lipid-trafficking defect in Niemann-Pick disease type C*. *Neurobiol Dis* 2004;16:654-8.
- 22 Lee WC, Courtenay A, Troendle FJ. *Enzyme replacement therapy results in substantial improvements in early clinical phenotype in a mouse model of globoid cell leukodystrophy*. *FASEB J* 2005;19:1549-51.
- 23 Malatack JJ, Consolini DM, Bayever E. *The status of haematopoietic stem cell transplantation in lysosomal storage disease*. *Pediatr Neurol* 2003;29:391-403.
- 24 Muller FJ, Snyder EY, Loring JF. *Gene therapy: can neural stem cell deliver*. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:75-84.
- 25 Paschen W, Mengesdorf T. *Endoplasmic reticulum stress response and neurodegeneration*. *Cell Calcium* 2005;38:409-15.
- 26 Roces DP, Lullmann-Rauch R, Peng J. *Efficacy of enzyme replacement therapy in alpha mannosidosis mice: a preclinical animal study*. *Hum Mol Genet* 2004;13:1979-88.
- 27 Rovelli AM, Steward CG. *Hematopoietic cell transplantation activity in Europe for inherited metabolic diseases: open issues and future directions*. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35(Suppl 1):S23-6.
- 28 Spencer BJ, Verma IM. *Targeted delivery of proteins across the blood-brain barrier*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:7594-9.
- 29 Tessitore PMM, Sano R, Ma Y, et al. *GM1-ganglioside-mediated activation of the unfolded protein response causes neuronal death in a neurodegenerative gangliosidosis*. *Mol Cell* 2004;15:753-66.
- 30 Vogler C, Levy B, Grubb JH. *Overcoming the blood brain barrier with high dose enzyme replacement therapy in murine mucopolysaccharidosis*. *VII Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:14777-82.
- 31 www.wiley.co.uk/genmed/clinical