

# Nuovi approcci terapeutici alle malattie da accumulo lisosomiale

**Giancarlo Parenti, Caterina Porto, Roberto Della Casa**

*Dipartimento di Pediatria, Università Federico II, Napoli*

## Sommario

Le malattie da accumulo lisosomiale (LSD) sono un gruppo di malattie metaboliche ereditarie causate dal deficit di una delle diverse funzioni lisosomiali. Le LSD sono tipicamente caratterizzate dall'accumulo di substrati complessi in diversi tessuti e organi. Le manifestazioni cliniche di queste malattie sono spesso responsabili di handicap fisici e neurologici. Negli ultimi due decenni la ricerca ed il miglioramento delle conoscenze sulla fisiopatologia delle LSD hanno consentito lo sviluppo di tecnologie e di approcci terapeutici altamente innovativi. Questi approcci comprendono strategie che hanno lo scopo di aumentare l'attività residua dell'enzima mancante, quali il trapianto di cellule staminali ematopoietiche, la terapia enzimatica sostitutiva, la terapia con *chaperones* farmacologici e la terapia genica, nonché approcci basati sulla riduzione della sintesi del substrato accumulato. I recenti progressi compiuti nel trattamento delle LSD rappresentano un buon modello che potrebbe essere esteso anche ad altre malattie genetiche.

## Summary

*The lysosomal storage diseases (LSDs) are a group of inherited metabolic disorders due to the deficiency of any of the lysosomal functions, in most cases of the lysosomal hydrolases. LSDs are typically characterized by the storage of a variety of substrates in multiple tissues and organs and by the variable association of peculiar clinical manifestations that are often responsible for physical and neurological handicaps. During the past two decades the research in the field of LSDs has made impressive progress, particularly with the development of a variety of innovative therapeutic approaches. These include several strategies aimed at increasing the residual activity of the missing enzyme, such as hematopoietic stem cell transplantation, enzyme replacement therapy, pharmacological chaperone therapy and gene therapy. An alternative approach is based on reducing the synthesis of the stored substrate. More recently the improved knowledge on LSDs pathophysiology has indicated additional targets of therapy. The recent progresses made in the treatment of LSDs represent a good model that may be extended to other genetic disorders.*

## Introduzione

Le malattie da accumulo lisosomiale (*lysosomal storage diseases*, LSD) sono un gruppo di malattie metaboliche ereditarie causate da mutazioni in geni che codificano per enzimi, proteine integrali di membrana e proteine di trasporto a localizzazione lisosomiale (Futerman and van Meer, 2004). La mutazione di questi geni comporta quindi un difetto di una o più delle diverse funzioni dei lisosomi, organelli subcellulari deputati al *turnover* e riciclo di una vasta gamma di molecole complesse, tra cui sfingolipidi, glicosaminoglicani, glicoproteine e glicogeno.

La caratteristica principale delle LSD è pertanto l'accumulo all'interno dei lisosomi di questi substrati. In generale l'accumulo si osserva in diversi tessuti e organi. Di conseguenza le manifestazioni fenotipiche di questi disturbi sono complesse, e caratterizzate dall'associazione variabile di manifestazioni viscerali, oculari, ematologiche, scheletriche e neurologiche. Queste manifestazioni sono nella maggior parte dei casi responsabili di handicap fisici e neurologici. In particolare, quelle relative al coinvolgimento del sistema nervoso centrale (SNC) possono causare neurodegenerazione progressiva e grave compromissione cognitiva.

Attualmente sono note circa 50 LSD che sono tradizionalmente classificate secondo le caratteristiche chimiche del substrato accumulato. Anche se ognuna di queste patologie è rara se considerata singolarmente, la loro prevalenza globale è relativamente elevata rispetto ad altri gruppi di malattie rare, ed è stimata in circa 1 su 8.000 nati vivi (Fuller et al., 2006).

## Obiettivo

All'interno della revisione sarà fornita una rassegna delle nuove strategie terapeutiche basate sul miglioramento delle conoscenze della fisiopatologia delle malattie lisosomiali.

È stata svolta una ricerca attraverso PubMed utilizzando termini chiave come: "lysosomal storage disease; therapy; enzyme replacement therapy; substrate reduction; gene therapy; hematopoietic stem cell transplantation", anche tra loro incrociati. Sono stati selezionati articoli originali, revisioni, e linee guida più recenti.

## L'interesse delle malattie lisosomiali per il pediatra

Come molte malattie rare le LSD sono meno note ai pediatri generalisti. Tuttavia la loro prevalenza globale, gli effetti debilitanti delle loro manifestazioni cliniche ed il loro pesante impatto in termini di salute pubblica e di costi assistenziali devono essere motivi di interesse ed attenzione per i tutti pediatri. Il riconoscimento tempestivo di queste malattie, grazie ad un corretto sospetto diagnostico, può consentire di intervenire precocemente quando il fenotipo non è ancora severo. Inoltre, per la necessità di un approccio multidisciplinare alla gestione di queste malattie, esse devono essere ben note anche a tutti gli specialisti coinvolti nell'assistenza dei pazienti con LSD.

In aggiunta a questi motivi più squisitamente clinici, un motivo di particolare interesse per le LSD è legato al fatto che soprattutto negli ultimi decenni esse hanno rappresentato un modello per lo sviluppo di approcci terapeutici altamente innovativi, basati su tecnologie molto avanzate e potenzialmente esportabili ad altre malattie genetiche (Beck, 2007).

Diversi fattori hanno fornito uno stimolo ai progressi nel trattamento delle LSD. La disponibilità di tecnologie che consentono la produzione, purificazione e manipolazione su larga scala di nuovi farmaci, proteine ricombinanti e vettori virali, ha giocato un ruolo importante in questo senso, insieme alla legislazione in materia di farmaci orfani, che ha incoraggiato le aziende biotecnologiche ad investire nella ricerca di nuove terapie per le malattie rare (Beutler, 2006). Tuttavia, il fattore che ha maggiormente stimolato lo sviluppo di nuove terapie per le LSD, e che rappresenta un modello anche per altre patologie, è stato l'avanzamento delle conoscenze sulla fisiopatologia e sui meccanismi cellulari e molecolari alla base di queste malattie.

## I progressi nella comprensione della fisiopatologia delle LSD e le loro implicazioni terapeutiche

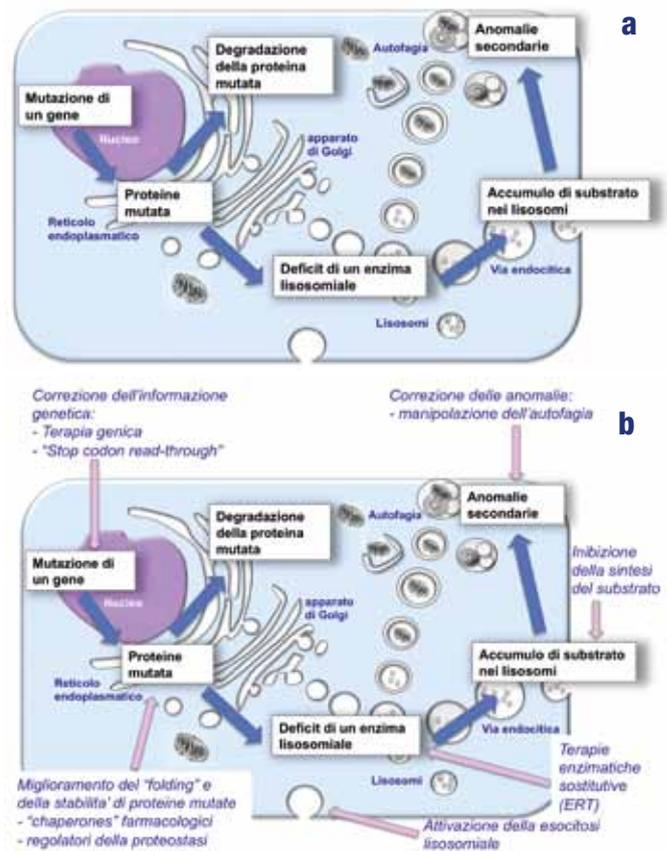
La cascata di eventi alla base della patogenesi delle LSD (Fig. 1A) è innescata da mutazioni dei geni codificanti per proteine coinvolte nella funzione lisosomiale, in massima parte enzimi lisosomiali. La conseguenza è la totale assenza di una proteina o la sintesi di una proteina non funzionale, malconformata nella sua struttura terziaria, che viene riconosciuta come alterata dai sistemi di controllo di qualità della cellula e per tale motivo viene degradata. La conseguenza a livello dei lisosomi è l'impossibilità di degradare uno specifico substrato, che quindi si accumula nei lisosomi. È diventato ormai chiaro che l'accumulo di substrati all'interno del compartimento lisosomiale è soltanto il *primum movens* di una serie di risposte cellulari secondarie che hanno come risultato finale la morte cellulare ed il danno di tessuti e organi. L'accumulo dei substrati non degradati interferisce, infatti, con diverse funzioni cellulari, con meccanismi che comprendono l'attivazione di recettori da parte di ligandi non fisiologici, la modulazione di risposte recettoriali e di cascate di trasduzione del segnale, l'attivazione di una risposta infiammatoria, l'alterato traffico intracellulare di vescicole, di membrane e di proteine legate alle membrane, l'alterazione dei meccanismi legati all'autofagia (Ballabio and Gieselmann, 2009).

La precisa conoscenza di questi meccanismi è di importanza cruciale perché ciascuno degli eventi nella cascata patogenetica delle LSD è un potenziale bersaglio della terapia. Di conseguenza è possibile che vari approcci, basati su differenti strategie e razionale, ognuno mirato ad un diverso bersaglio terapeutico, possano essere sfruttati, singolarmente o in combinazione, per il trattamento di queste patologie (Fig. 1B).

## La terapia delle LSD

Fino a circa due decenni fa il trattamento di pazienti affetti da LSD era basato esclusivamente su terapie palliative o di supporto. Le prime strategie terapeutiche dirette verso la correzione del difetto di base di queste malattie sono state introdotte nei primi anni '90, e da allora un certo numero di nuovi approcci sono stati divenuti disponibili o testati in studi preclinici.

L'approccio più ovvio per correggere le malattie da perdita di funzione, come le LSD, causate nella maggior parte dei casi dal deficit funzionale di una idrolasi lisosomiale, è quello di ripristinare o sostituire l'attività enzimatica deficitaria. Quindi, la maggior parte dei metodi finora sviluppati per trattare le LSD sono volti ad aumentare i livelli dell'enzima mancante in cellule e tessuti. Questi approcci si basano sul trapianto di cellule staminali ematopoietiche (*hematopoietic stem cell transplantation*, HSCT), sulla terapia enzimatica sostitutiva



**Figura 1.**

**A.** La cascata di eventi alla base della patogenesi delle LSD è innescata da mutazioni dei geni codificanti per proteine coinvolte nella funzione lisosomiale, in massima parte enzimi lisosomiali. La conseguenza è la totale assenza di una proteina o la sintesi di una proteina non funzionale, malconformata nella sua struttura terziaria, che viene riconosciuta come alterata dai sistemi di controllo di qualità della cellula e per tale motivo viene degradata. La conseguenza a livello dei lisosomi è l'impossibilità di degradare uno specifico substrato, che quindi si accumula nei lisosomi. L'accumulo innesca meccanismi secondari, ad esempio anomalie dell'autofagia, che sono responsabili del danno cellulare e tissutale.

**B.** Ciascuno degli eventi nella cascata patogenetica delle LSD è un potenziale bersaglio della terapia. La maggior parte dei metodi finora sviluppati sono volti ad aumentare i livelli di dell'enzima mancante, come la terapia enzimatica sostitutiva (*enzyme replacement therapy*, ERT), la terapia farmacologica con molecole *chaperone* (*pharmacological chaperone therapy*, PCT), la terapia genica (*gene therapy*, GT). Un approccio alternativo, la terapia di riduzione del substrato (SRT), si basa sull'uso di inibitori della sintesi dei substrati accumulati nei lisosomi. Di recente sono stati proposti approcci ancora più innovativi, basati sulla correzione delle anomalie cellulari secondarie o sulla stimolazione della esocitosi lisosomiale.

(*enzyme replacement therapy*, ERT), sulla terapia farmacologica con molecole *chaperone* (*pharmacological chaperone therapy*, PCT), e sulla terapia genica (*gene therapy*, GT). Questi tipi di approccio possono risultare particolarmente adatti per disordini come le LSD, nelle quali si assume che i sintomi clinici nei pazienti si presentino solo quando il livello dell'enzima residuo scende al di sotto di una soglia critica. Pertanto attività residue superiori a circa il 10% del livello normale possono, in linea di principio, essere sufficienti per impedire l'accumulo, ed è possibile ipotizzare che anche lievi aumenti di

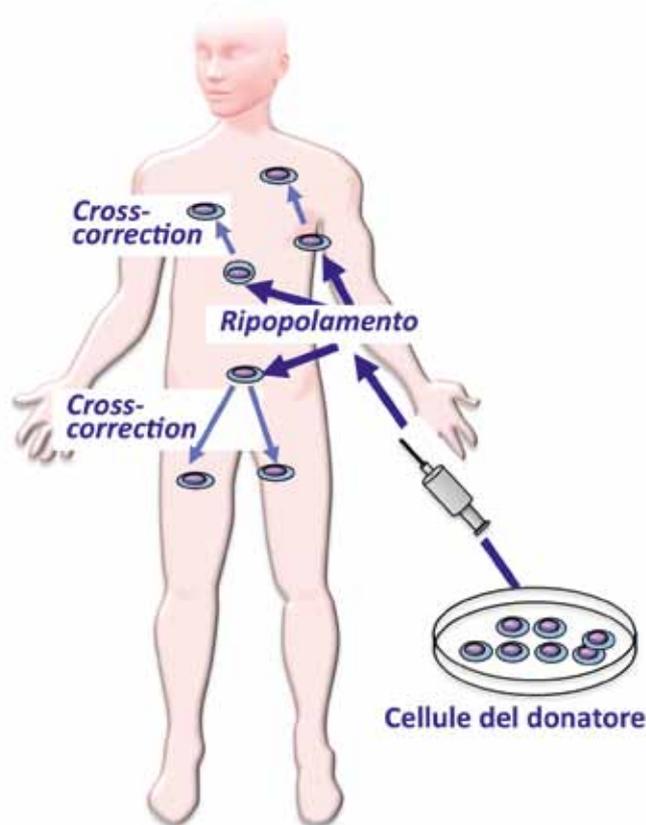
attività enzimatica si possano tradurre in un beneficio clinico per i pazienti.

Un approccio alternativo, la terapia di riduzione del substrato (SRT), si basa sull'uso di inibitori della sintesi dei substrati accumulati nei lisosomi.

Negli ultimi anni, grazie al miglioramento delle conoscenze sulla fisiopatologia delle LSD, sono state proposte, inoltre, altre strategie terapeutiche innovative che sono in corso di valutazione in studi pre-clinici.

## Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT)

L'HSCT è stato il primo approccio terapeutico introdotto per il trattamento delle LSD. Il midollo osseo è stato tradizionalmente usato come fonte di cellule da trapiantare per questa procedura. Tuttavia, negli ultimi anni, molti pazienti sono stati trattati con trapianti da sangue di cordone ombelicale da donatore non correlato, che permette un rapido e più facile accesso al trapianto (Prasad and Kurtzberg, 2010). Per l'HSCT l'agente terapeutico sono le cellule staminali ematopoietiche derivate da un donatore sano. Con questo approccio può



**Figura 2.**

Per l'HSCT l'agente terapeutico sono le cellule staminali ematopoietiche derivate da un donatore sano. Con questo approccio può essere ottenuto un duplice effetto. Uno è quello di ripopolare tessuti specifici da parte delle cellule sane del donatore. Un secondo effetto è conseguenza della secrezione di idrolasi lisosomiali funzionali da parte delle cellule del donatore nello spazio extracellulare e nella circolazione sanguigna. L'enzima normale secreto può essere, infatti, assorbito dalle cellule riceventi e correggere il difetto dell'enzima in queste cellule (effetto definito come *cross-correction*).

essere ottenuto un duplice effetto (Fig. 2). Uno è quello di ripopolare tessuti specifici da parte delle cellule sane del donatore. Un secondo effetto, molto importante, è conseguenza della secrezione di idrolasi lisosomiali funzionali da parte delle cellule del donatore nello spazio extracellulare e nella circolazione sanguigna. L'enzima normale secreto può essere, infatti, assorbito dalle cellule riceventi e correggere il difetto dell'enzima in queste cellule (effetto definito come *cross-correction*).

L'esperienza clinica finora ottenuta con il trapianto, tuttavia, suggerisce che questa procedura deve limitarsi a poche malattie lisosomiali. Il trapianto è risultato efficace per il trattamento della mucopolisaccaridosi (MPS) tipo I (Valayannopoulos et al., 2011) ed ha effetti benefici sulle manifestazioni viscerali nella MPS VI, nella malattia di Krabbe pre-sintomatica o ad insorgenza tardiva, e nelle forme attenuate di leucodistrofia metacromatica (Orchard et al., 2007). Per la MPS I le indicazioni, i tempi ottimali, la sicurezza e l'efficacia di trapianto sono stati recentemente esaminati da un gruppo europeo di specialisti che hanno partecipato ad un *consensus* su questo approccio (de Ru et al, 2011). Secondo tale *consensus* l'HSCT è considerato il trattamento preferenziale per i pazienti con MPS I gravi, che hanno ricevuto la diagnosi prima dell'età di 2 anni e mezzo, e può essere preso in considerazione anche in singoli pazienti con fenotipi intermedi se vi è un donatore idoneo.

Per la malattia di Krabbe e la leucodistrofia metacromatica, il fenotipo della malattia e la gravità della malattia al momento del trapianto sono di fondamentale importanza nel determinare il risultato (Orchard and Tolar, 2010).

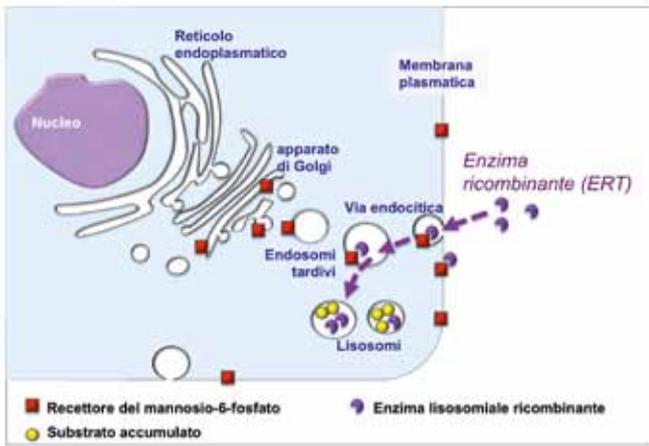
Un potenziale vantaggio dell'HSCT è che alcune cellule di derivazione del donatore sono in grado di migrare al cervello e di produrre enzimi normali che possono essere internalizzati dalle cellule neurali del ricevente con il meccanismo di *cross-correction* precedentemente citato. In linea di principio, quindi, questa procedura ha la possibilità di migliorare le funzioni neurocognitive e la qualità della vita, in particolare, quando eseguita precocemente nel corso della malattia.

D'altra parte l'uso dell'HSCT è limitato dal rischio di mortalità legato alla procedura, dalla scarsa disponibilità di donatori idonei, dal numero esiguo di patologie che possono essere trattate con questo approccio e dall'insufficiente attecchimento e correzione della patologia in alcuni tessuti, quali ossa e cuore.

## La terapia enzimatica sostitutiva (ERT)

La ERT ha rappresentato la più importante acquisizione degli ultimi decenni nel trattamento delle LSD. Questo approccio si basa su infusioni endovenose periodiche di enzimi lisosomiali ricombinanti umani, prodotti e purificati su larga scala da fonti diverse con tecniche di DNA ricombinante. Una volta iniettati, gli enzimi ricombinanti si distribuiscono ai tessuti, vengono internalizzati dalle cellule ed indirizzati al compartimento lisosomiale, dove devono sopperire alla disfunzione dell'enzima difettoso.

Lo sviluppo della ERT è un eccellente esempio di come i progressi nella conoscenza della biologia lisosomiale possano favorire lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici. Il razionale della ERT, infatti, si è evoluto a partire da studi sui meccanismi molecolari e cellulari coinvolti nel traffico e la secrezione degli enzimi lisosomiali. Questi studi hanno dimostrato che le idrolasi lisosomiali recano sulla loro struttura marcatori, cioè il mannosio o il mannosio-6-fosfato, che sono riconosciuti da specifici recettori presenti nella cellula. Grazie a questi recettori gli enzimi neo-sintetizzati dalla cellula vengono indirizzati al compartimento lisosomiale, laddove devono svolgere



**Figura 3.**

Gli enzimi lisosomiali recano sulla loro struttura marcatori, quali il mannosio ed il mannosio-6-fosfato, che sono riconosciuti dagli specifici recettori presenti nella cellula. Grazie a questi recettori gli enzimi neo-sintetizzati dalla cellula vengono indirizzati al compartimento lisosomiale, laddove devono svolgere la loro funzione. I recettori del mannosio o del mannosio-6-fosfato sono espressi anche sulla membrana plasmatica delle cellule e questo fa sì che enzimi lisosomiali ricombinanti prodotti e purificati in laboratorio possano essere “captati” dalle cellule, e seguendo il percorso della via endocitica, essere correttamente trasportati ai lisosomi. Una volta raggiunti i lisosomi gli enzimi ricombinanti possono rimpiazzare l'enzima deficitario e degradare il substrato accumulato.

la loro funzione. I recettori del mannosio o del mannosio-6-fosfato sono espressi però anche sulla membrana plasmatica delle cellule (Sly, 1985). Questo fa sì che enzimi lisosomiali ricombinanti prodotti e purificati in laboratorio possano essere “captati” dalle cellule, e seguendo il percorso della via endocitica, essere correttamente trasportati ai lisosomi (Fig. 3).

I primi tentativi di sviluppare una ERT sono stati effettuati nella malattia di Gaucher, una malattia dovuta al deficit di beta-glucosidasi caratterizzata da visceromegalia, coinvolgimento osseo e segni ematologici. Dopo oltre due decenni di esperienza clinica con migliaia di pazienti trattati, il successo della ERT è stato chiaramente documentato in questa malattia. È stato definitivamente dimostrato che la ERT è efficace nel migliorare le manifestazioni viscerali, ematologiche e biochimiche nella malattia di Gaucher e nel migliorare la qualità di vita dei pazienti.

Il successo della ERT nella malattia di Gaucher (Barton et al., 1991; Barton et al., 1990), ha stimolato lo sviluppo di questo approccio per il trattamento dei altre LSD, in generale quelle più prevalenti, per le quali la ERT è attualmente considerata la terapia standard.

Nella malattia di Fabry, una malattia lisosomiale dovuta al deficit di alfa-galattosidasi A e che coinvolge prevalentemente endoteli vascolari, cuore, rene e sistema nervoso periferico, sono stati documentati effetti benefici sulle funzioni cardiache e renali, con riduzione del dolore e miglioramento della qualità della vita (Mehta et al., 2009; Lidove et al., 2010; Feriozzi et al., 2012). Inoltre, la riduzione dei livelli plasmatici ed urinari del substrato accumulato avvalorano l'efficacia della ERT.

Nella malattia di Pompe, dovuta al deficit di alfa-glucosidasi acida e che si manifesta con un quadro di miopatia generalizzata, l'esperienza clinica ha mostrato effetti sorprendenti sulla cardiomiopatia, con rapida riduzione dell'indice di massa ventricolare sinistra. Inoltre la ERT ha prolungato significativamente la sopravvivenza dei pazien-

ti affetti dalla forma più severa ad esordio precoce (van der Ploeg-Reuser, 2008), ed ha migliorato le prestazioni fisiche, stabilizzando o migliorando la funzione muscolare, nei pazienti ad esordio tardivo (Strothotte et al., 2010; van der Ploeg et al., 2010).

Nelle MPS I, II e VI l'impiego della ERT ha consentito un miglioramento delle prestazioni generali, delle funzioni respiratorie e della qualità della vita (Valayannopoulos et al., 2011). Un marcatore biochimico di efficacia della ERT in queste patologie è la ridotta escrezione urinaria di glicosaminoglicani nei pazienti trattati.

Alla luce dei successi della ERT in queste patologie l'uso di questo approccio è stato proposto ed in corso di studio anche per il trattamento anche di altre LSD, tra cui la MPS IVA (malattia di Morquio A), la MPS VII (malattia di Sly), la MPSIIIA (malattia di Sanfilippo A), la leucodistrofia metacromatica, la mannosidosi, ed il deficit di lipasi acida.

D'altra parte, l'esperienza clinica con la ERT ha dimostrato che questo approccio ha alcuni limiti, principalmente legati alla biodisponibilità degli enzimi ricombinanti. Gli enzimi ricombinanti sono grandi molecole che non diffondono liberamente attraverso le membrane e non sono in grado di raggiungere concentrazioni terapeutiche in alcuni dei tessuti bersaglio. Pertanto, un certo numero di tessuti rimangono refrattari a questo trattamento e alcuni pazienti in trattamento con ERT mostrano un beneficio clinico limitato o continuano a mostrare segni di progressione della malattia. Limitazioni della ERT sono state osservate nelle MPSI, II e VI, dove i risultati terapeutici sono insufficienti in tessuti quali ossa, cartilagine e cuore, che peraltro sono tra gli organi maggiormente interessati dalla patologia. Nella malattia di Pompe a livello del muscolo scheletrico i benefici della ERT sono in alcuni casi insufficienti (Parenti and Andria, 2011). Di rilevanza clinica ancora maggiore è l'incapacità degli enzimi ricombinanti di attraversare la barriera ematoencefalica e di raggiungere il sistema nervoso centrale (Anson et al., 2001; Begley et al., 2008). In circa due terzi dei pazienti affetti da LSD è presente coinvolgimento neurologico e neurodegenerazione progressiva. In questi casi, quindi, l'impossibilità di ottenere livelli correttivi di enzimi nel cervello è una grave limitazione alla efficacia terapeutica della ERT. Per aggirare questi problemi e aumentare i livelli terapeutici di enzimi ai tessuti bersaglio, tra cui sistema nervoso centrale, sono in corso di valutazione diverse strategie. Purtroppo, tutte queste strategie sono ancora in fase largamente sperimentale.

Sono stati fatti diversi tentativi di ottenere livelli correttivi di attività enzimatica nel cervello nelle LSD neuropatiche, manipolando chimicamente gli enzimi ricombinanti. Ad esempio la beta-glucuronidasi, l'enzima carente nella MPSVII, è stata modificata per aumentare l'emivita plasmatica e facilitarne il traffico attraverso la barriera ematoencefalica (Grubb et al., 2008). Altri approcci che vengono attualmente esplorati sono basati sulla penetrazione recettore mediata della barriera ematoencefalica, mediante coniugazione degli enzimi ricombinanti con molecole di transferrina al fine di sfruttare l'endocitosi mediata da recettori di tale proteina per il trasporto attraverso la barriera (Osborn et al., 2008).

Oltre a questi approcci è stata sperimentata anche una procedura invasiva, che prevede somministrazione intratecale della ERT, valutata in studi pre-clinici per diverse patologie lisosomiali e introdotta in terapia umana per la MPS I (Munoz-Rojas et al., 2008).

Sono stati effettuati anche tentativi per migliorare il *targeting* della ERT ai muscoli scheletrici nella malattia di Pompe. Nel 2009 è stata sviluppata (Zhu et al., 2009) una rhGAA ingegnerizzata nella componente oligosaccaridica (neo-rhGAA), nella quale sono state aggiunte ulteriori residui di mannosio 6-fosfato. Questa neo-rhGAA ha mostrato una maggiore affinità per il recettore del mannosio-6-fosfato.

In un modello murino di malattia di Pompe l'enzima così modificato ha mostrato una maggiore capacità correttiva e di conseguenza una più efficace riduzione del glicogeno lisosomiale nei muscoli rispetto all'enzima tradizionale. Altri approcci sono basati sulla fusione sulla rhGAA con un peptide derivato dall'*insulin-like growth factor 2* (IGF-II), che è anch'esso un ligando per il recettore del mannosio-6-fosfato.

Un altro fattore che non va assolutamente sottovalutato e che può rappresentare un'ulteriore limitazione per la ERT, è rappresentato dagli elevati costi degli enzimi ricombinanti. Gli investimenti iniziali per la ricerca ed i costi relativi alla produzione di grandi quantità di enzimi ricombinanti secondo i criteri della *good manufacturing practice*, ha contribuito a mantenere i costi della ERT estremamente elevati. Il trattamento di un singolo paziente affetto da LSD può richiedere perciò fino a diverse centinaia di migliaia di euro all'anno. Tali costi elevati, che sono accettabili nei paesi occidentali, sono difficilmente accessibili nei paesi del terzo mondo o nei paesi emergenti, e limitano quindi l'accesso dei pazienti alla ERT. La disponibilità di nuove tecnologie molecolari, tuttavia, apre una speranza per consentire la produzione di preparazioni enzimatiche meno costose. Ad esempio, la beta-glucosidasi ricombinante, l'enzima carente nella malattia di Gaucher, è stato prodotto anche in specie vegetali o in cellule derivate da vegetali (Zimran et al., 2011).

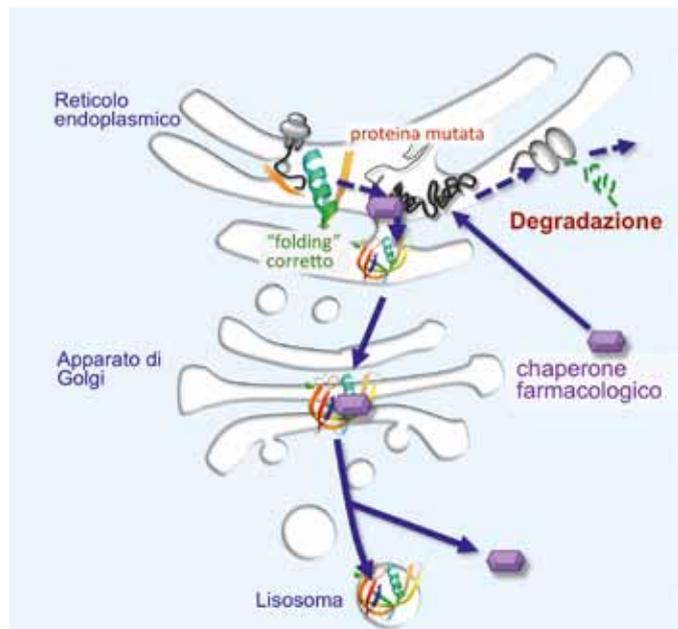
### La terapia con *chaperones* farmacologici (PCT)

Come si è detto in precedenza uno dei meccanismi implicati nella patogenesi delle LSD è la sintesi di proteine enzimatiche alterate nella loro conformazione tridimensionale, in quanto derivate dai geni recanti mutazioni missenso. Tali proteine sono riconosciute dalla cellula e degradate. In queste malattie, definite da *misfolding* proteico, la perdita di funzione non è quindi dovuta alla perdita di attività catalitica della proteina mutata, ma è il risultato della degradazione della proteina.

Un approccio che ha recentemente attirato molto interesse per il trattamento delle malattie dovute a *misfolding* proteico in generale e in particolare per le LSD è la stimolazione enzimatica con piccole molecole definite *chaperones* farmacologici (Parenti, 2009; Valenzano et al., 2011). È stato dimostrato che gli *chaperones* farmacologici possono interagire fisicamente con la proteina mutata, favorendone la corretta conformazione facendo in un certo senso da stampo, e migliorandone la stabilità. Come risultato l'attività enzimatica della proteina mutata viene parzialmente recuperata (Fig. 4).

Come per la ERT e gli altri approcci diretti verso la sostituzione o l'aumento dell'attività residua dell'enzima difettoso, è ragionevole ipotizzare che anche un piccolo incremento dell'attività potrebbe avere un impatto favorevole sullo stato dei pazienti e sulla progressione della malattia.

L'uso di *chaperones* farmacologici per il trattamento di malattie da accumulo lisosomiale è stato proposto per la prima volta nella malattia di Fabry (Fan et al., 1999). In cellule di pazienti con malattia di Fabry è stato dimostrato che uno dei più potenti inibitori dell'alfa-galattosidasi A, la 1-deossigalattosidasi (DGJ), paradossalmente stimolava l'attività residua dell'alfa-galattosidasi A. Tale effetto era osservato anche *in vivo*, in topi transgenici che iperesprimevano una forma di alfa-galattosidasi A mutata (Germain and Fan, 2009). Lo stesso approccio è stato successivamente valutato per un numero limitato di altre malattie di questo gruppo (Parenti, 2009; Valenzano et al., 2011), compresa la malattia di Gaucher (Sawkar et al., 2005) e la malattia di Pompe (Parenti et al., 2007; Okumiya et al., 2007). In linea di principio, gli *chaperones* (come tutte le piccole molecole)



**Figura 4.**

A causa di mutazioni missenso gli enzimi lisosomiali mutati sono alterati nella loro conformazione tridimensionale, riconosciuti dalla cellula e degradati.

Gli *chaperones* farmacologici possono interagire fisicamente con la proteina mutata, favorendone la corretta conformazione, migliorandone la stabilità e favorendone il corretto traffico verso i lisosomi, dove il complesso *chaperone*-enzima si dissocia. Come risultato l'attività enzimatica della proteina mutata viene parzialmente recuperata.

hanno diversi vantaggi, rispetto alla ERT, in quanto possono essere assunti oralmente, consentendo un trattamento non invasivo, non sono immunogenici e non hanno bisogno di essere captati dalle cellule attraverso il recettore del mannosio-6-fosfato, che può essere secondariamente compromesso in alcune di queste patologie. Inoltre, si assume che queste piccole molecole *chaperone* diffondano liberamente attraverso le membrane cellulari e raggiungano concentrazioni terapeutiche in diversi tessuti e sistemi, inclusi sistema nervoso centrale. Nel modello animale di gangliosidosi GM1, un grave disturbo neurodegenerativo dovuto al deficit di beta-galattosidasi, l'uso dello *chaperone* N-ottil-4-epi- $\beta$ -valienamine (Noev) ha consentito un aumento dell'attività residua nel cervello e una migliore *clearance* del substrato (Suzuki et al., 2012).

D'altra parte anche i farmaci *chaperones* possono presentare limitazioni. La terapia con questi farmaci sembra essere praticabile solo in pazienti con specifiche mutazioni responsive, per lo più situate in specifici domini strutturali dell'enzima (Flanagan et al., 2009).

Resta inoltre preoccupazione ai fini dell'impiego di tali molecole in clinica il fatto che la maggior parte degli *chaperones* finora individuati per il trattamento delle LSD sono molecole che interagiscono con i siti attivi degli enzimi. In altre parole, esse sono inibitori competitivi degli enzimi bersaglio, anche se ci sono evidenze che nell'ambito dei lisosomi tale effetto inibitorio non si verifichi.

In linea di principio, queste limitazioni possono essere superate mediante l'individuazione di nuove molecole che interagiscono con altri domini proteici, diversi dal sito attivo. Recentemente, sono stati identificati i primi *chaperones* allosterici per l'alfa-glucosidasi, l'enzima carente nella malattia di Pompe, mediante la combinazione di una caratterizzazione biochimica ed un'analisi computazionale delle interazioni di questi farmaci con l'enzima (Porto et al., 2012).

*Screening* ad ampio spettro (*high throughput screenings*) di librerie chimiche potrebbe essere un metodo rapido ed efficiente per identificare altri *chaperones* di nuova generazione (Urban et al., 2008; Marugan et al., 2010).

Dopo gli studi *in vitro*, che hanno consentito di identificare potenziali *chaperones* farmacologici per il trattamento delle LSD, la ricerca si sta ora spostando verso la traduzione clinica. Studi clinici in Fase 1/2 sono stati condotti per le malattie di Fabry, Gaucher e Pompe. Per la malattia di Fabry, studi clinici di fase 2/3 hanno mostrato risultati incoraggianti in termini di potenziamento dell'attività enzimatica residua dell'alfa-galattosidasi A e *clearance* del substrato [<http://www.amicustherapeutics.com/clinicaltrials/at1001.asp>].

## La combinazione di *chaperones* ed ERT

Sebbene la terapia con *chaperones* sia stata sviluppata come strategia per proteggere gli enzimi mutati dalla degradazione intracellulare, studi recenti hanno dimostrato che questi farmaci sono anche in grado di migliorare la stabilità fisica e potenziare l'azione terapeutica degli enzimi normali, in particolare quelli utilizzati per la ERT (Porto et al., 2009; Porto et al., 2012; Benjamin et al., 2012; Khanna et al., 2012). Questi studi, effettuati in sistemi cellulari e nei modelli animali delle malattie di Pompe e di Fabry, hanno fatto da apripista per un importante cambiamento nell'uso degli *chaperones*. In entrambe le patologie, quando gli enzimi ricombinanti sono stati somministrati in associazione con le molecole *chaperoniche*, il traffico ai lisosomi, la maturazione e l'attività intracellulare (in altri termini l'efficacia) degli enzimi ricombinanti usati per la ERT è risultata notevolmente migliorata.

Sebbene il meccanismo alla base dell'effetto sinergico tra *chaperones* farmacologici ed ERT non sia ancora del tutto chiaro, questa sinergia può avere importanti vantaggi rispetto all'uso "tradizionale" degli *chaperones* per proteggere enzimi mutati dalla degradazione. Innanzitutto, in questo caso l'effetto terapeutico è diretto verso l'enzima esogeno normale, quello utilizzato per la ERT, e quindi è indipendente dalla mutazione del paziente. Questo significa che tale effetto può essere sfruttato in tutti i pazienti trattati con ERT e non solo in quelli che hanno specifiche mutazioni (Porto et al., 2012; Porto et al., 2012).

In secondo luogo, mentre la stimolazione mediante *chaperones* degli enzimi endogeni mutati nella maggior parte dei casi sfocia in piccoli aumenti in termini di attività residua (probabilmente con un esito modesto sul decorso clinico dei pazienti), la sinergia tra *chaperones* e ERT induce apparentemente, almeno in modelli cellulari, notevoli aumenti di attività specifica con una correzione completa o quasi completa del difetto enzimatico.

Studi clinici basati sulla combinazione di *chaperones* ed ERT sono già in corso (*Trials* NCT00214500 e NCT01196871 a <http://clinicaltrials.gov>; Telethon fondazione Trial GUP09017, <http://www.telethon.it/ricerca-progetti/progetti-finanziati>).

## I farmaci regolatori della proteostasi

In aggiunta alla terapia con *chaperones*, sono stati proposti altri approcci deputati al salvataggio degli enzimi mutati nelle LSD. Mentre, come si è detto in precedenza, gli *chaperones* sono ligandi che interagiscono specificamente con le proteine mutate (e sono quindi in grado di salvare una singola proteina), altri farmaci sono in grado di regolare i meccanismi cellulari che controllano l'omeostasi delle proteine, definita "proteostasi". La proteostasi è un complesso in-

sieme di meccanismi che controllano la sintesi, la conformazione (il *folding*), il traffico, l'aggregazione, e la degradazione delle proteine. Piccole molecole, definiti regolatori della proteostasi, hanno la capacità di regolare le funzioni di questo *network*, e sono potenzialmente in grado di ripristinare il normale equilibrio tra sintesi e degradazione delle proteine. È stato dimostrato che due di questi regolatori della proteostasi erano in grado di ripristinare la funzione di due enzimi lisosomiali mutati in due distinte LSD, quali malattia di Gaucher, di cui si è parlato in precedenza, e la gangliosidosi G<sub>M2</sub>, una grave malattia neurodegenerativa dovuta al deficit di beta-esosaminidasi (Mu et al., 2008). Questo approccio, tuttavia, è ancora in gran parte sperimentale.

## La terapia genica (GT)

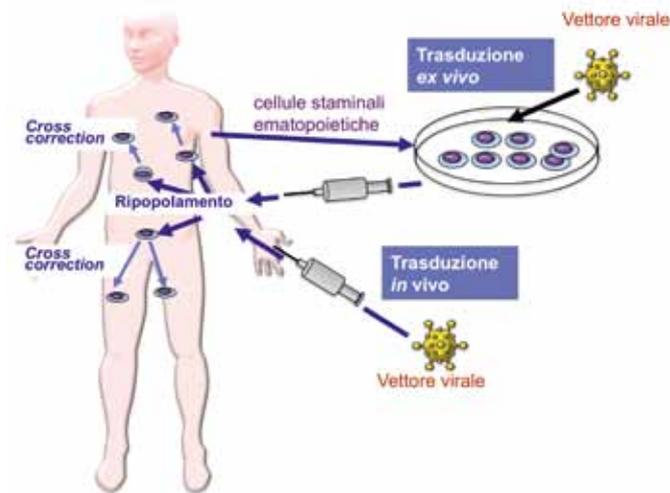
La GT è una strategia interessante che rappresenta una grande promessa per i pazienti affetti da LSD ed è comunemente vista come l'approccio che ha le maggiori potenzialità per la correzione completa e prolungata del difetto enzimatico (Sands and Davidson, 2006; Cardone, 2007). La GT è anche un ottimo esempio di una strategia che si sta sviluppando grazie alla combinazione di una migliore conoscenza delle basi molecolari delle LSD, e dei progressi tecnici ottenuti nell'ottimizzazione e preparazione di agenti terapeutici, in questo caso i vettori virali.

La GT, come tutti i metodi già citati, è finalizzata ad aumentare o ripristinare l'attività dell'enzima carente nelle cellule dei pazienti. Questo risultato non è ottenuto rimpiazzando l'enzima difettoso con un enzima ricombinante funzionante, ma fornendo la copia normale del gene mutato, contenuta in un vettore virale che verrà introdotto nelle cellule mediante infezione, e che consentirà la sintesi dell'enzima normale nelle cellule che l'avranno ricevuto.

Questo approccio terapeutico sembra essere particolarmente adatto per il trattamento delle LSD per diversi motivi. Primo, queste patologie sono monogeniche ed è teoricamente possibile curarle correggendo il difetto genetico. In secondo luogo, anche se solo un piccolo numero di cellule conterrà copie normali del gene mutato in grado di sintetizzare l'enzima normale, sarà possibile correggere le cellule adiacenti tramite una *cross-correction*, grazie al fatto che la maggior parte degli enzimi lisosomiali vengono secreti e ricaptati tramite il recettore del mannosio-6-fosfato. Tale *cross-correction*, simile a quella documentata nell'HSCT, evita la necessità di trasferire il gene in tutte le cellule, con il vantaggio che una piccola percentuale di cellule trasdotte potrebbe agire terapeuticamente con conseguenti benefici per molti organi. Infine, come già detto, anche lievi aumenti di attività enzimatica (fino al 10%) potrebbero essere sufficienti per un beneficio clinico e per un sia pur parziale correzione fenotipica. Sono state progettati diversi vettori virali e diverse strategie per realizzare il trasferimento genico in vivo. Sono stati testati come vettori Herpes virus, lentivirus, virus adeno-associati (AAV), adenovirus (Ad) ed altri (Sands and Davidson, 2006). La modificazione genetica può essere eseguita sia *ex vivo* che *in vivo* (Fig. 5). La prima strategia prevede la modificazione *ex vivo* di cellule ed il trapianto delle cellule modificate nei pazienti. Le cellule che vengono comunemente considerate come bersagli terapeutici per le LSD sono cellule progenitriche ematopoietiche.

Un'altra strategia testata è basata invece sulla GT diretta *in vivo*. Questo approccio si basa sulla iniezione di un vettore di trasferimento genico direttamente in un tessuto o in circolo.

Il vantaggio di un approccio con GT rispetto alla ERT è la potenziale espressione della proteina terapeutica a lungo termine. Pertanto, questo approccio potrebbe rappresentare una procedura definitiva,



**Figura 5.**

La GT è finalizzata ad aumentare o ripristinare l'attività dell'enzima carente nelle cellule dei pazienti fornendo la copia normale del gene mutato, contenuta in un vettore virale, che consente la sintesi dell'enzima normale nelle cellule che ricevono il vettore.

Anche se solo un piccolo numero di cellule conterrà copie normali del gene mutato, in grado di sintetizzare l'enzima normale, grazie al fatto che la maggior parte degli enzimi lisosomiali sono secreti, l'enzima potrà comunque essere captato tramite il recettore del mannosio-6-fosfato, dalle cellule adiacenti non infettate. Tale *cross-correction*, è simile a quella documentata nell'HSCT.

La GT può essere eseguita sia *ex vivo* che *in vivo*. La prima strategia prevede la modificazione *ex vivo* di cellule, in genere cellule staminali ematopoietiche, che vengono modificate in laboratorio e reiniettate nel paziente. Un'altra strategia testata è basata invece sulla GT diretta *in vivo*. Questo approccio si basa sull'iniezione di un vettore di trasferimento genico direttamente in un tessuto o in circolo al fine di ottenere direttamente la modificazione genetica delle cellule del ricevente.

con vantaggi evidenti rispetto alla ERT, che richiede la somministrazione periodica di enzimi per via endovenosa, e alle terapie con piccole molecole, che necessitano di una somministrazione giornaliera e per tutta la vita. Un altro vantaggio è che la GT può essere disponibile per i pazienti con patologie così rare per le quali lo sviluppo di un enzima per la ERT sarebbe una impresa commercialmente non vantaggiosa.

Anche se la GT è un trattamento promettente per le LSD, restano alcune problematiche aperte. Il problema principale è la sicurezza del vettore virale e la possibilità di carcinogenesi conseguente al trasferimento genico mediato da retrovirus o adenovirus. In questo senso i vettori AAV potrebbero risultare vantaggiosi e più sicuri in quanto non sono patogenici e generalmente non si integrano nel genoma dell'ospite. Una seconda considerazione è che i vettori generalmente esprimono livelli sovra-fisiologici di enzima e non è noto se questo sia del tutto sicuro negli esseri umani.

Altri problemi sono legati alle dosi di vettori da utilizzare, alla scelta dei vettori per ottenere la migliore correzione possibile in specifici tessuti ed organi, nonché alla possibilità di risposta immunitaria verso l'enzima normale prodotto grazie alla GT, che potrebbe essere una proteina "estranea" per il paziente.

Inoltre, modificare geneticamente o far arrivare l'enzima normale prodotto nei tessuti trasdotti al sistema nervoso centrale rimane un problema irrisolto. Ciò è dovuto anche in questo caso alla presenza

della barriera ematoencefalica, che esclude gli enzimi lisosomiali esogeni dal cervello. Per le LSD con manifestazioni neuropatiche è stata studiata come possibile strategia l'iniezione intracerebrale del vettore virale. Nel modello animale del deficit multiplo di solfatasi (*multiple sulfatase deficiency, MSD*), una grave malattia autosomica recessiva, causata da mutazioni nel gene di un fattore che rende attive le solfatasi (*SUMF1*), la combinazione di somministrazione sistemica e intracerebrale del vettore recante il gene *SUMF1* normale ha consentito correzione del difetto genetico, la quasi completa clearance dei glicosaminoglicani, e ha migliorato *performance* fisica degli animali (Spampanato et al., 2011).

La GT è in fase di studio per diverse malattie, per lo più in studi pre-clinici condotti in modelli animali delle LSD. Tuttavia, i primi studi clinici sono già in corso o in fase di preparazione.

### La terapia di riduzione del substrato – SRT

La SRT si basa sul concetto che l'inibizione di specifiche tappe delle vie biosintetiche dei substrati possono ridurre il loro flusso ai lisosomi, contribuendo così a ristabilire l'equilibrio tra la loro sintesi e il catabolismo (Platt and Jeyakumar, 2008; Schiffmann, 2010). Questa operazione viene generalmente eseguita utilizzando farmaci inibitori di enzimi coinvolti nella biosintesi dei substrati.

SRT è stata già approvata per l'uso clinico nel trattamento della malattia di Gaucher di tipo 1, la forma più lieve di questa malattia, e per la malattia di Niemann-Pick di tipo C (NPC), una grave malattia caratterizzata da manifestazioni viscerali (epatosplenomegalia, colestasi, pneumopatia) e da manifestazioni neurodegenerative, e dovuta ad un difetto del traffico intracellulare del colesterolo.

L'esperienza clinica più ampia per questo approccio è stata ottenuta con l'uso dell' N-butildeossinojirimicina (Miglustat) nella malattia di Gaucher. In questa malattia il Miglustat ha dimostrato di essere efficace nel migliorare o stabilizzare markers biochimici, viscerali, ematologici e ossei della malattia (Giraldo et al., 2009), causando limitati eventi avversi (Hollak et al., 2009).

Un nuovo inibitore del substrato, l'Eliglustat tartrato, è stato recentemente introdotto e valutato in uno studio clinico aperto, multicentrico, di fase 2 (Lukina et al., 2010). Il trattamento con Eliglustat tartrato ha migliorato i livelli di emoglobina e la conta piastrinica, ridotto il volume della milza e del fegato, e favorito una maggiore densità ossea della colonna vertebrale nella zona lombare.

È stato dimostrato nella NPC che i glicosfingolipidi giocano un ruolo patogenetico nel coinvolgimento cerebrale (Lachmann et al., 2004). Pertanto, è stato proposto l'utilizzo del Miglustat, lo stesso agente terapeutico usato per la malattia di Gaucher, nei pazienti con NPC. In uno studio controllato in 29 pazienti adulti e giovani con NPC, il Miglustat si è dimostrato in grado di stabilizzare i disturbi neurologici, migliorando i movimenti orizzontali saccadici degli occhi, stabilizzando la deambulazione, e migliorando la deglutizione (Patterson et al., 2007; Wraith et al., 2010). Un miglioramento della deglutizione è stato anche osservato in uno studio sull'efficacia del Miglustat in quattro pazienti pediatriche (Fecarotta et al., 2011).

L'approccio basato sulla SRT è stato esteso anche al trattamento delle MPS. Gli studi pre-clinici e clinici in questo caso erano basati sull'uso di inibitori non specifici della sintesi dei glicosaminoglicani, quali la genisteina e la rodamina B, un colorante chimico (Piotrowska et al., 2006; Roberts et al., 2006; Roberts et al., 2010; Malinowska et al., 2010). Gli effetti di questi farmaci, tuttavia, sono stati finora molto variabili. In due anni di *follow-up* di otto pazienti MPS III (Piotrowska et al., 2011) trattati con genisteina, cinque pazienti hanno mostrato un miglioramento o una stabilizzazione delle funzio-

ni cognitive, mentre tre hanno mostrato un ulteriore peggioramento. La SRT è stata proposta anche in alcuni studi pre-clinici per il trattamento di altre LSD, come la malattia di Sandhoff (Ashe et al., 2011), la malattia di Fabry (Marshall et al., 2010), e la malattia di Pompe (Douillard-Guilloux et al., 2008; Douillard-Guilloux et al., 2010). Anche gli inibitori della sintesi del substrato, essendo piccole molecole, presentano vantaggi rispetto all'uso di ERT e GT, in particolare in termini di biodisponibilità in vari tessuti ed organi, compreso il sistema nervoso centrale.

## Altri approcci sperimentali

L'avanzamento delle conoscenze sulle basi molecolari delle malattie genetiche e sulla fisiopatologia delle LSD ha recentemente aperto nuove prospettive terapeutiche.

Ad esempio, è stato dimostrato che la manipolazione del *pathway* dell'autofagia ha un effetto benefico nel modello murino della malattia di Pompe. La soppressione genetica dell'autofagia nel topo Pompe è responsabile di una riduzione dal 50% al 60% dell'accumulo di glicogeno nel muscolo scheletrico rispetto ai topi in cui l'autofagia non era geneticamente soppressa (Raben et al., 2010). Inoltre, in modelli murini Pompe in cui l'autofagia era soppressa l'efficacia della ERT è risultata notevolmente migliorata, con una *clearance* quasi completa del glicogeno nel muscolo scheletrico, un obiettivo terapeutico mai raggiunto in topi con malattia di Pompe con autofagia normale.

Sono state sviluppate anche strategie terapeutiche per indurre *read-through* ribosomiale di mutazioni di stop nel mRNA e consentire la produzione proteina funzionale. In altri termini, grazie ad alcuni farmaci, le mutazioni di stop non vengono riconosciute e la sintesi della proteina può continuare fino al codone di stop canonico. Farmaci come aminoglicosidi e Ataluren (PTC124) sono efficaci in tal senso e sono in fase di sperimentazione clinica in pazienti affetti da diverse malattie genetiche, come Becker / distrofia muscolare di Duchenne, la fibrosi cistica, la metilmalonico acidemia e altre (Jones-Helm, 2009; Nelson et al., 2009; Sermet-Gaudelus et al., 2010; Finkel et al., 2010). In linea di principio, la soppressione di mutazioni nonsense potrebbe offrire nuove prospettive anche per il trattamento di pazienti con altre malattie genetiche causate da un'anticipata interruzione di lettura ribosomiale, comprese le LSD. Questo approccio è stato esplorato

in studi pre-clinici in cellule di ceroidolipofuscinosi con deficit di palmitoil-tioesterasi (Sarkar et al., 2011).

Un approccio totalmente nuovo e affascinante per il trattamento delle LSD è di recente emerso grazie a nuove scoperte sulla biologia dei lisosomi. È stato dimostrato che la biogenesi dei lisosomi e la sintesi degli enzimi lisosomiali sono regolate da un fattore di trascrizione chiamato TFEB (Sardiello et al., 2009). Tra le altre funzioni di TFEB c'è quella di regolare anche l'esocitosi lisosomiale (Sardiello et al., 2009). La sovraespressione di TFEB, infatti, aumenta il numero di lisosomi nella periferia delle cellule e facilita la fusione dei lisosomi con la membrana plasmatica con conseguente espulsione del loro contenuto all'esterno della cellula. È possibile sfruttare questo effetto nelle LSD per favorire l'eliminazione del substrato accumulato nei lisosomi, anche se è presente un difetto enzimatico che impedisce la normale degradazione del substrato.

Si è infatti osservato sperimentalmente che la sovraespressione di TFEB riduce l'accumulo patologico nelle cellule e consente il recupero della normale morfologia cellulare in diverse LSD (malattia di Pompe, deficit multiplo di solfatasi, MPS III). Questi risultati indicano perciò una strategia terapeutica alternativa e totalmente innovativa per le LSD, non basata sull'incremento dell'attività enzimatica residua o sulla riduzione della sintesi del substrato.

## Conclusioni

Gli ultimi due decenni hanno visto notevolissimi progressi nel trattamento delle LSD. Diverse opzioni terapeutiche sono disponibili o sono in corso di valutazione in studi pre-clinici. Tuttavia, nessuna di queste opzioni è applicabile a tutte le malattie lisosomiali e la maggior parte degli approcci hanno importanti limitazioni, relative a biodisponibilità degli agenti terapeutici, tossicità, risposta immunitaria, e impatto sulla qualità di vita del paziente.

La ricerca futura sarà indispensabile per affrontare questi problemi. Particolare attenzione deve essere prestata alla chiara definizione di linee guida per il trattamento dei pazienti. In questo senso sarà utile la raccolta accurata di informazioni in registri internazionali sulla storia naturale delle LSD, e sugli effetti delle terapie.

La possibilità di combinare diversi approcci e di personalizzare protocolli di trattamento per ogni disturbo e per ogni singolo paziente potrà rappresentare una strategia vincente al fine di ottenere la massima efficacia terapeutica.

## Box di orientamento

### *Che cosa si sapeva prima*

*Le malattie lisosomiali sono state a lungo considerate malattie trattabili soltanto con terapie di supporto. Negli ultimi venti anni sono iniziati i primi tentativi terapeutici con la terapia enzimatica sostitutiva e con il trapianto di cellule staminali ematopoietiche.*

### *Che cosa sappiamo adesso*

*L'avanzamento delle conoscenze sulla fisiopatologia e sui meccanismi cellulari e molecolari alla base delle malattie lisosomiali ha fortemente stimolato lo sviluppo di nuove terapie per queste malattie. Oggi sono in corso di valutazione o già in fase di applicazione clinica altre strategie terapeutiche, quali la terapia di riduzione del substrato, la terapia farmacologica con molecole chaperone e la terapia genica.*

### *Quali ricadute sulla pratica clinica*

*Si sono aperte nuove prospettive per il trattamento di pazienti affetti da malattie da accumulo lisosomiale. La disponibilità di diversi approcci terapeutici potrà consentire la scelta dell'approccio migliore per la singola malattia e nel singolo paziente, consentendo di personalizzare la terapia. L'esperienza ottenuta con le terapie già disponibili già oggi consente di fornire linee guida per il trattamento dei pazienti.*

## Bibliografia

- Anson DS, McIntyre C, Byers S. *Therapies for neurological disease in the mucopolysaccharidoses*. *Curr Gene Ther*. 2011;11:132-43.
- Ashe KM, Bangari D, Li L, et al. *Iminosugar-based inhibitors of glucosylceramide synthase increase brain glycosphingolipids and survival in a mouse model of Sandhoff disease*. *PLoS One* 2011;6:e21758.
- Ballabio A, Gieselmann V. *Lysosomal disorders: from storage to cellular damage*. *Biochim Biophys Acta* 2009;1793:684-96.
- \*\* Importante revisione sulle nuove conoscenze in merito alla fipatologia delle malattie lisosomiali.
- Barton NW, Brady RO, Dambrosia JM, et al. *Replacement therapy for inherited enzyme deficiency--macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease*. *N Engl J Med*. 1991;324:1464-70.
- Barton NW, Furbish FS, Murray GJ, et al. *Therapeutic response to intravenous infusions of glucocerebrosidase in a patient with Gaucher disease*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:1913-6.
- Beck M. *New therapeutic options for lysosomal storage disorders: enzyme replacement, small molecules and gene therapy*. *Hum Genet*. 2007;121:1-22.
- Begley DJ, Pontikis CC, Scarpa M. *Lysosomal storage diseases and the blood-brain barrier*. *Curr Pharm Des*. 2008;14:1566-80.
- \*\* Revisione delle problematiche connesse al superamento della barriera emato-encefalica nelle malattie lisosomiali.
- Benjamin ER, Khanna R, Schilling A, et al. *Co-administration with the pharmacological chaperone AT1001 increases recombinant human  $\alpha$ -galactosidase A tissue uptake and improves substrate reduction in Fabry mice*. *Mol Ther*. 2012;20:717-26.
- \* Beutler E. *Lysosomal storage diseases: natural history and ethical and economic aspects*. *Mol Genet Metab*. 2006;88:208-15.
- Cardone M. *Prospects for gene therapy in inherited neurodegenerative diseases*. *Curr Opin Neurol*. 2007;20:15-8.
- de Ru MH, Boelens JJ, Das AM, et al. *Enzyme replacement therapy and/or hematopoietic stem cell transplantation at diagnosis in patients with mucopolysaccharidosis type I: results of a European consensus procedure*. *Orphanet J Rare Dis*. 2011;6:55.
- Douillard-Guilloux G, Raben N, Takikita S, et al. *Modulation of glycogen synthesis by RNA interference: towards a new therapeutic approach for glycogenosis type II*. *Hum Mol Genet*. 2008;17:3876-86.
- Douillard-Guilloux G, Raben N, Takikita S, et al. *Restoration of muscle functionality by genetic suppression of glycogen synthesis in a murine model of Pompe disease*. *Hum Mol Genet*. 2010;19:684-96.
- Fan JQ, Ishii S, Asano N, et al. *Accelerated transport and maturation of lysosomal alpha-galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor*. *Nat Med*. 1999;5:112-5.
- \*\* Il primo lavoro pionieristico sull'effetto chaperone in una malattia lisosomiale.
- Fecarotta S, Amitrano M, Romano A, et al. *The videofluoroscopic swallowing study shows a sustained improvement of dysphagia in children with Niemann-Pick disease type C after therapy with miglustat*. *Am J Med Genet*. 2011;155A:540-7.
- Feriozzi S, Torras J, Cybulla M, et al. *FOS Investigators: The effectiveness of long-term agalsidase alfa therapy in the treatment of Fabry nephropathy*. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012;7:60-9.
- Finkel RS. *Read-Through Strategies for Suppression of Nonsense Mutations in Duchenne/Becker Muscular Dystrophy: Aminoglycosides and Ataluren (PTC124)*. *J Child Neurol*. 2010;25:1158-64.
- Flanagan JJ, Rossi B, Tang K, et al. *The pharmacological chaperone 1-deoxy-*N*-jirimycin increases the activity and lysosomal trafficking of multiple mutant forms of acid alpha-glucosidase*. *Hum Mutat*. 2009;30:1683-92.
- Fuller M, Meikle PJ, Hopwood JJ. *Epidemiology of lysosomal storage diseases: an overview*. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, editors. *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. Oxford: Oxford PharmaGenesis, 2006.
- \* Futerman AH and van Meer G. *The cell biology of lysosomal storage disorders*. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5:554-65.
- Germain DP, Fan JQ. *Pharmacological chaperone therapy by active-site-specific chaperones*. In: *Fabry disease: in vitro and preclinical studies*. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2009;47:111-7.
- Giraldo P, Alfonso P, Atutxa K, et al. *Real-world clinical experience with long-term miglustat maintenance therapy in type 1 Gaucher disease: the ZAGAL project*. *Haematologica* 2009;94:1771-5.
- Grubb JH, Vogler C, Levy B, et al. *Chemically modified beta-glucuronidase crosses blood-brain barrier and clears neuronal storage in murine mucopolysaccharidosis VII*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:2616-21.
- Hollak CE, Hughes D, van Schaik IN, et al. *Miglustat (Zavesca) in type 1 Gaucher disease: 5-year results of a post-authorisation safety surveillance programme*. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2009;18:770-7.
- Jones AM, Helm JM. *Emerging treatments in cystic fibrosis*. *Drugs* 2009;69:1903-10.
- Khanna R, Flanagan JJ, Feng J, et al. *The Pharmacological Chaperone AT2220 Increases Recombinant Human Acid  $\alpha$ -Glucosidase Uptake and Glycogen Reduction in a Mouse Model of Pompe Disease*. *PLoS One* 2012;7:e40776.
- Lachmann RH, te Vrugte D, Lloyd-Evans E, et al. *Treatment with miglustat reverses the lipid-trafficking defect in Niemann-Pick disease type C*. *Neurobiol Dis*. 2004;16:654-8.
- Lidove O, West ML, Pintos-Morell G, et al. *Effects of enzyme replacement therapy*. In: *Fabry disease – a comprehensive review of the medical literature*. *Genet Med*. 2010;12:668-79.
- Lukina E, Watman N, Arreguin EA. *Improvement in hematological, visceral, and skeletal manifestations of Gaucher disease type 1 with oral eliglustat tartrate (Genz-112638) treatment: 2-year results of a phase 2 study*. *Blood* 2010;116:4095-8.
- Malinowska M, Wilkinson FL, Langford-Smith KJ, et al. *Genistein improves neuropathology and corrects behaviour in a mouse model of neurodegenerative metabolic disease*. *PLoS One* 2010;5:e14192.
- Marshall J, Ashe KM, Bangari D, et al. *Substrate reduction augments the efficacy of enzyme therapy in a mouse model of Fabry disease*. *PLoS One* 2010;5:e15033.
- Marugan JJ, Zheng W, Motabar O, et al. *Evaluation of 2-thioxo-2,3,5,6,7,8-hexahydropyrimido[4,5-d]pyrimidin-4(1H)-one analogues as GAA activators*. *Eur J Med Chem*. 2010;45:1880-97.
- \* Medina DL, Fraldi A, Bouche V, et al. *Transcriptional activation of lysosomal exocytosis promotes cellular clearance*. *Dev Cell*. 2011;21:421-30.
- Mehta A, Beck M, Elliott P, et al. *Fabry Outcome Survey investigators. Enzyme replacement therapy with agalsidase alfa in patients with Fabry's disease: an analysis of registry data*. *Lancet* 2009;374:1986-96.
- Mu TW, Ong DS, Wang YJ, et al. *Chemical and biological approaches synergize to ameliorate protein-folding diseases*. *Cell Sep*. 2008;134:769-81.
- \* Studio di biologia cellulare che esplora i rapporti tra proteostasi cellulare e possibili applicazioni alle malattie lisosomiali.
- Munoz-Rojas MV, Vieira T, Costa R, et al. *Intrathecal enzyme replacement therapy in a patient with mucopolysaccharidosis type I and symptomatic spinal cord compression*. *Am J Med Genet*. 2008;146A:2538-44.
- Nelson SF, Crosbie RH, Miceli MC, et al. *Emerging genetic therapies to treat Duchenne muscular dystrophy*. *Curr Opin Neurol*. 2009;22:532-8.
- Okumiya T, Kroos MA, Vliet LV, et al. *Chemical chaperones improve transport and enhance stability of mutant alpha-glucosidases in glycogen storage disease type II*. *Mol Genet Metab*. 2007;90:49-57.
- Orchard PJ, Tolar J. *Transplant outcomes in leukodystrophies*. *Semin Hematol*. 2010;47:70-8.
- Orchard PJ, Blazar BR, Wagner J, et al. *Hematopoietic cell therapy for metabolic disease*. *J Pediatr*. 2007;151:340-6.
- \*\* Revisione sintetica e comprensiva dell'uso del trapianto di cellule staminali ematopoietiche nelle malattie lisosomiali.
- Osborn MJ, McElmurry RT, Peacock B, et al. *Targeting of the CNS in MPS-IH using a nonviral transferrin-alpha-L-iduronidase fusion gene product*. *Mol Ther*. 2008;16:1459-66.
- Parenti G, Andria G. *Pompe Disease: From New Views on Pathophysiology to Innovative Therapeutic Strategies*. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011;12:902-15.
- Parenti G, Zuppaldi A, Pittis MG, et al. *Pharmacological enhancement of mutated alpha-glucosidase activity in fibroblasts from patients with Pompe disease*. *Mol Ther*. 2007;15:508-14.
- Parenti G. *Treating lysosomal storage diseases with pharmacological chaperones: from concept to clinics*. *EMBO Mol Med* 2009;1:268-79.
- Patterson MC, Vecchio D, Prady H, et al. *Miglustat for treatment of Niemann-Pick C disease: a randomised controlled study*. *Lancet Neurol* 2007;6:765-72.
- Piotrowska E, Jakóbkiewicz-Banecka J, Barańska S, et al. *Genistein-mediated inhibition of glycosaminoglycan synthesis as a basis for gene expression-targeted isoflavone therapy for mucopolysaccharidoses*. *Eur J Hum Genet* 2006;14:846-52.
- Piotrowska E, Jakóbkiewicz-Banecka J, Maryniak A, et al. *Two-year follow-up of Sanfilippo Disease patients treated with a genistein-rich isoflavone extract*:

- assessment of effects on cognitive functions and general status of patients. *Med Sci Monit* 2011;17:196-202.
- Platt FM, Jeyakumar M. *Substrate reduction therapy*. *Acta Paediatr Suppl* 2008;97:88-93.
- \*\* Revisione della letteratura sull'uso della riduzione del substrato per la cura delle malattie lisosomiali.
- Porto C, Cardone M, Fontana F, et al. *The pharmacological chaperone N-butyldeoxyjirimycin enhances enzyme replacement therapy in Pompe disease fibroblasts*. *Mol Ther*. 2009;17:964-71.
- \*\* Per la prima volta viene dimostrata in vitro ed in vivo un possibile sinergia tra chaperones farmacologici e terapia enzimatica sostitutiva.
- Porto C, Ferrara MC, Meli M, et al. *Pharmacological Enhancement of  $\alpha$ -Glucosidase by the Allosteric Chaperone N-acetylcysteine*. *Mol Ther*. 2012;20:2201-11.
- Porto C, Pisani A, Rosa M, et al. *Synergy between the pharmacological chaperone 1-deoxygalactonojirimycin and the human recombinant alpha-galactosidase A in cultured fibroblasts from patients with Fabry disease*. *J Inher Metab Dis*. 2012;35:513-20.
- \* Prasad VK, Kurtzberg J. *Transplant outcomes in mucopolysaccharidoses*. *Semin Hematol*. 2010;47:70-8.
- Raben N, Schreiner C, Baum R, et al. *Suppression of autophagy permits successful enzyme replacement therapy in a lysosomal storage disorder – murine Pompe disease*. *Autophagy* 2010;6:1078-89.
- Roberts AL, Fletcher JM, Moore L, et al. *Trans-generational exposure to low levels of rhodamine B does not adversely affect litter size or liver function in murine mucopolysaccharidosis type IIIA*. *Mol Genet Metab*. 2010;101:208-13.
- Roberts AL, Thomas BJ, Wilkinson AS, et al. *Inhibition of glycosaminoglycan synthesis using rhodamine B in a mouse model of mucopolysaccharidosis type IIIA*. *Pediatr Res*. 2006;60:309-14.
- Sands MS, Davidson BL. *Gene therapy for lysosomal storage diseases*. *Mol Ther*. 2006;13:839-49.
- \*\* Revisione della letteratura sullo stato dell'arte per la terapia genica per le malattie lisosomiali e sulle diverse strategie per l'uso di tale approccio terapeutico.
- Sardiello M, Palmieri M, di Ronza A, et al. *A gene network regulating lysosomal biogenesis and function*. *Science* 2009;325:473-7.
- \*\* Studio innovativo sulla funzione lisosomiale. Viene dimostrato che la biogenesi dei lisosomi e la sintesi degli enzimi lisosomiali sono coordinate da un sistema di regolazione dell'espressione genica. Lo studio ha aperto la strada a possibili applicazioni terapeutiche.
- Sarkar C, Zhang Z, Mukherjee AB. *Stop codon read-through with PTC124 induces palmitoyl-protein thioesterase-1 activity, reduces thioester load and suppresses apoptosis in cultured cells from INCL patients*. *Mol Genet Metab*. 2011;104:338-45.
- Sawkar AR, Adamski-Werner SL, Cheng WC, et al. *Gaucher disease-associated glucocerebrosidases show mutation-dependent chemical chaperoning profiles*. *Chem Biol*. 2005;12:1235-44.
- \* Schiffmann R. *Therapeutic approaches for neuronopathic lysosomal storage disorders*. *J Inher Metab Dis*. 2010;33:373-9.
- Sermet-Gaudelus I, De Boeck K, Casimir GJ, et al. *Ataluren (PTC124) Induces CFTR Protein Expression and Activity in Children with Nonsense Mutation Cystic Fibrosis*. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182:1262-72.
- Sly WS. *Receptor-mediated transport of acid hydrolases to lysosomes*. *Curr Top Cell Regul*. 1985;26:27-38.
- Spampanato C, De Leonibus E, Dama P, et al. *Efficacy of a combined intracerebral and systemic gene delivery approach for the treatment of a severe lysosomal storage disorder*. *Mol Ther*. 2011;19:860-9.
- Strothotte S, Strigl-Pill N, Grunert B, et al. *Enzyme replacement therapy with alglucosidase alfa in 44 patients with late-onset glycogen storage disease type 2: 12-month results of an observational clinical trial*. *J Neurol*. 2010;257:91-7.
- Suzuki Y, Ichinomiya S, Kurosawa M, et al. *Therapeutic chaperone effect of N-octyl 4-epi- $\beta$ -valienamine on murine G(M1)-gangliosidosis*. *Mol Genet Metab*. 2012;106:92-8.
- Urban DJ, Zheng W, Goker-Alpan O, et al. *Optimization and validation of two miniaturized glucocerebrosidase enzyme assays for high throughput screening*. *Comb Chem High Throughput Screen* 2008;11:817-24.
- \* Valayannopoulos V, Wijburg FA. *Therapy for the mucopolysaccharidoses*. *Rheumatology* 2011;50:49-59.
- Valenzano KJ, Khanna R, Powe AC, et al. *Identification and characterization of pharmacological chaperones to correct enzyme deficiencies in lysosomal storage disorders*. *Assay Drug Dev Technol*. 2011;9:213-35.
- van der Ploeg AT, Reuser AJ. *Pompe's disease*. *Lancet* 2008;372:1342-53.
- van der Ploeg AT, Clemens PR, Corzo D, et al. *A randomized study of alglucosidase alfa in late-onset Pompe's disease*. *N Engl J Med*. 2010;362:1396-406.
- Wraith JE, Vecchio D, Jacklin E, et al. *Miglustat in adult and juvenile patients with Niemann-Pick disease type C: long-term data from a clinical trial*. *Mol Genet Metab*. 2010;99:351-7.
- Zhu Y, Jiang JL, Gumlaw NK, et al. *Glycoengineered acid alpha-glucosidase with improved efficacy at correcting the metabolic aberrations and motor function deficits in a mouse model of Pompe disease*. *Mol Ther*. 2009;17:954-63.
- Zimran A, Brill-Almon E, Chertkoff R, et al. *Pivotal trial with plant cell-expressed recombinant glucocerebrosidase, taliglucerase alfa, a novel enzyme replacement therapy for Gaucher disease*. *Blood* 2011;118:5767-73.

## Corrispondenza

Giancarlo Parenti, Dipartimento di Pediatria, Università Federico II, Via S. Pansini 5, Napoli. Tel. +39 081 7463390. Fax +39 081 7463116. E-mail: parenti@unina.it