

## **Progetto di Terapia Genica per la malattia di Lesch-Nyhan**

### **Riassunto sulla ricerca in corso a iSTEM**

Da qualche anno, tre gruppi di ricerca di iSTEM lavorano in modo complementare sulla malattia di Lesch-Nyhan.

*Nota: iSTEM ([www.istem.eu](http://www.istem.eu)) è il più grande laboratorio francese di ricerca dedicato allo sviluppo di cellule staminali umane pluripotenti. È nato dalla collaborazione fra INSERM – Istituto Nazionale della Salute e della Ricerca Medica – e AFM-Telethon – Associazione Francese contro le Miopatie).*

A partire da biopsie cutanee provenienti da 4 pazienti affetti da malattia di Lesch-Nyhan, queste équipes sono riuscite a creare delle cellule staminali pluripotenti (iPSC) e a farle sviluppare in neuroni corticali (neuroni coinvolti nelle funzioni cognitive e intellettuali elaborate).

*Nota: le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC), possono, in linea di principio, trasformarsi in qualunque altro tipo di cellula umana, tra cui i vari tipi di neuroni del cervello. Tuttavia si deve trovare la giusta « ricetta » per ottenere ciascun tipo di cellula.*

Una delle équipes di iStem attualmente cerca di far sì che le iPSC si sviluppino in neuroni dopaminergici. Questi neuroni sono quelli che sintetizzano la dopamina, che utilizzano come neurotrasmettitore e di cui sappiamo che la disfunzione è una delle cause dei problemi motori del Parkinson, della Lesch-Nyhan e anche di altre malattie con movimenti anomali. Il sistema dopaminergico è anche coinvolto nella comparsa delle automutilazioni nella malattia di Lesch-Nyhan e in alcune forme di autismo.

Uno degli scopi di questi lavori sulle iPSC dei pazienti Lesch-Nyhan è quello di capire come l'assenza del gene HPRT e quindi dell'enzima omonimo, influisca sullo sviluppo dei neuroni nel cervello e causi i sintomi neurologici della malattia (come distonie e automutilazione). Poiché il legame fra l'assenza dell'HPRT e l'assenza o il malfunzionamento dei neuroni dopaminergici è ancora un mistero (a differenza del legame fra acido urico e problemi renali che è invece già ben compreso).

La terza équipe di iStem lavora su un progetto di screening a banda larga che permetta di testare in vitro 20.000 molecole per vedere quelle fra loro che potrebbero eventualmente compensare l'assenza di hprt nelle cellule dei pazienti L-N.

Parallelamente a questi lavori, l'iStem ha anche avviato una riflessione sui possibili approcci con terapia genica.

## **Il progetto di Terapia Genica**

Il 12 maggio 2014, iStem ha annunciato ad alcuni rappresentanti dell'associazione francese *Lesch-Nyhan Action* ([www.lesch-nyhan-action.org](http://www.lesch-nyhan-action.org)) che a seguito dei risultati positivi dei test iniziali, sta intraprendendo uno studio preclinico di terapia genica per la malattia di Lesch-Nyhan.

### Definizioni:

- *Il principio della terapia genica è quello di iniettare un « vettore » (un virus modificato per non essere nocivo) che apporti a determinate cellule una versione corretta di uno o più geni. Questi geni corretti permetteranno poi alle cellule di creare gli enzimi di cui difettano.*
- *Uno studio preclinico è quello in cui si prova una terapia sugli animali per convalidare l'effetto del trattamento, per valutare il suo andamento e per conoscerne la tossicità (dosi massime, effetti secondari ecc.)*  
*Gli studi clinici sull'uomo avvengono dopo. Questi studi, su soggetti malati volontari, permettono di confermare gli effetti del trattamento e di identificare tutti gli effetti indesiderati, per poter poi richiedere l'autorizzazione per la commercializzazione.*

L'obiettivo di questa terapia genica per la malattia di Lesch-Nyhan è quello di ripristinare i livelli di dopamina nel cervello, per ridurre i sintomi neurologici della malattia.

Questo progetto è coordinato da Alessandra Benchoua e coinvolge iStem, la Scuola Nazionale di Veterinaria di Nantes ([www.oniris-nantes.fr](http://www.oniris-nantes.fr)) e una piccola società di biotecnologia britannica, già coinvolta nella terapia genica di un'altra malattia con movimenti anomali.

Partner a Nantes è il Centro di Ricerca e Investigazione Preclinica (C.R.I.P.). Si tratta di un centro specializzato nella validazione della terapia genica preclinica sugli animali. Il centro è cofinanziato dalla AFM. È il posto dove si tratteranno le manipolazioni sugli animali.

Il fondamento di questo progetto è quello di provare per la malattia di Lesch-Nyhan una terapia che è già stata testata con un certo successo su pazienti affetti da un'altra malattia con movimenti anomali (stabilizzazione dei livelli di dopamina e scomparsa di discinesie).

**Uno dei principali vantaggi di questo progetto è che il vettore e la terapia stessa sono stati già validati per un'altra malattia** Si deve solo, quindi, provarli per il caso specifico della malattia di Lesch-Nyhan (prima sugli animali e in seguito sugli uomini) E' un enorme risparmio di tempo.

Anche se c'è la speranza di poter lanciare una sperimentazione clinica nei prossimi anni, è difficile oggi annunciare un calendario, perché ci sono ancora molte incertezze. In primo luogo riguardo a ciò che dimostreranno le prove sugli animali. Poi, perché è sempre possibile che le autorità sanitarie esigano test su animali più grandi (cani o scimmie, per esempio) prima di passare all'uomo.

## Come funziona ?

Nel Parkinson, nella Lesch-Nyhan e anche in certe altre malattie con movimenti anomali, i neuroni dopaminergici sono assenti o carenti (per ragioni diverse, specifiche per ogni malattia). Poiché sono questi neuroni a produrre la dopamina, il livello di dopamina nel cervello è molto basso e ciò causa i diversi problemi motori che si osservano in queste malattie (e forse potrebbe anche essere una delle cause dell'autolesionismo nella malattia di Lesch-Nyhan).

Nel progetto di terapia genica in questione si utilizzerà un vettore (virus modificato) per introdurre nei neuroni non dopaminergici dei geni che consentano anche a loro di produrre dopamina. Ripristinando così i livelli di dopamina nel cervello, si spera di vedere miglioramenti per i sintomi neurologici della malattia.

Non si tratta quindi di curare i neuroni dopaminergici, ma di far fare il loro lavoro ad altri neuroni.

### Note :

- *L'iniezione del vettore nel cervello si fa con stereotassia (tecnica di neurochirurgia che permette di raggiungere zone del cervello con precisione). E' lo stesso metodo usato per fare le biopsie o per collocare gli elettrodi nel caso della stimolazione cerebrale profonda. E' anche la metodica utilizzata da Lysogène nello studio clinico della malattia di Sanfilippo ([www.lysogene.com](http://www.lysogene.com)).*
- *Questa iniezione viene eseguita una volta sola (dal momento che i geni sono introdotti, continueranno a funzionare da soli). E' quindi un trattamento in una sola « assunzione ».*
- *Il problema è che una volta che il vettore è collocato, non si può interrompere il trattamento (non è come per un farmaco che si può smettere di assumere se va male). E' per questo motivo che i test sugli animali sono importantissimi, per capire bene tutte le conseguenze del trattamento.*

In una prima fase, iStem ha provato questo vettore nelle scatole di Petri [ndt provette speciali] su dei neuroni non dopaminergici che erano stati creati a partire da iPSC normali o Lesch-Nyhan (quindi con o senza HPRT). Ha così potuto verificare che in tutti i casi, indipendentemente dalla presenza o assenza dell'HPRT, gli enzimi erano creati e la dopamina era sintetizzata. Questi sono i test in vitro che hanno dato il via libera per passare alla sperimentazione animale.

Ma per fare lo studio preclinico bisognava trovare il modello animale su cui fare le prove.

I topi transgenici senza HPRT sono un modello « genetico » per la malattia di Lesch-Nyhan comunemente usati. Tuttavia, benché questi topi non abbiano il gene HPRT (né l'enzima corrispondente) non presentano i sintomi della malattia (né automutilazione né distonie). Non sono dunque buoni modelli per la sperimentazione preclinica proposta da iStem. In particolare l'imaging o le autopsie su questi topi hanno mostrato una debole riduzione di dopamina, mentre negli esseri umani affetti da L-N la perdita di dopamina è molto più alta.

L'idea di iStem è quindi quella di utilizzare un altro modello animale della malattia. Si tratta di ratti, a cui non si cambia il codice genetico, ma a cui si sopprimono i neuroni dopaminergici iniettando una particolare sostanza, tre giorni dopo la loro nascita. Crescono quindi senza (o con molto poca) dopamina, come i bambini malati di Lesch-Nyhan. Il vantaggio di questi ratti è che una volta adolescenti o adulti, presentano molti sintomi simili a quelli della malattia di Lesch-Nyhan (problemi motori e automutilazione). Non si tratta dunque più di un modello « genetico », ma di un modello « fenotipico » della malattia di Lesch-Nyhan.

Questi ratti sono un modello già riconosciuto e validato dalle autorità per la malattia di Lesch-Nyhan. Sono d'altronde gli stessi che sono stati utilizzati nelle prove precliniche per l'Ecopipam (dr Richard Chipkin del laboratorio Psyadon Pharmaceuticals) :

Durante la ricerca, iStem sperimenterà l'iniezione del vettore in ratti di diversa età e studierà i risultati per diversi mesi. Ciò permetterà di studiare l'effetto del trattamento in funzione dell'età e della durata. In seguito, i ratti saranno sacrificati e sottoposti ad autopsia per misurare il tasso di dopamina prodotta (questa misurazione è difficile da fare tramite imaging poiché gli animali sono molto piccoli).

La manipolazione pilota si terrà a settembre/ottobre 2014, su un numero ridotto di animali. Poi sarà fatta su gruppi più grandi, per poter testare diverse possibilità (per esempio trattamenti in età diverse).

### **Altre osservazioni**

Oltre allo studio preclinico, sarebbe molto utile implementare uno studio di imaging su bambini (RM o meglio PET scan). Ma questo è difficile, soprattutto per la PET, perché è necessaria un'anestesia generale e l'iniezione di un prodotto radiattivo. E ciò sarà probabilmente autorizzato dal comitato etico solo nel quadro di una sperimentazione clinica (in cui il rischio è compensato dai potenziali benefici), ma non prima.

Inoltre, sia per lo studio d'imaging sia per un eventuale sperimentazione clinica, dobbiamo trovare un neurologo motivato e che possa essere coinvolto nel progetto.

- Fine della relazione -

Associazione Francese Lesch-Nyhan Action

[www.lesch-nyhan-action.org](http://www.lesch-nyhan-action.org)