



Artykuł opublikowany w How close are we to therapies for Sanfilippo disease?; Gaffke, L., Pierzynowska, K., Piotrowska, E. et al. Metab Brain Dis (2018) 33: 1. <https://doi.org/10.1007/s11011-017-0111-4>, tłumaczenie przygotowane przez Grzegorz Węgrzyn, Prace nad artykułem były wsparte grantem przekazany przez Fundację Sanfilippo.

Jak blisko jesteśmy odkrycia terapii dla choroby Sanfilippo?

Abstrakt

*Choroba Sanfilippo jest jedną z odmian mukopolisacharydozy (MPS), grupy lizosomalnych chorób spichrzeniowych, charakteryzującą się nagromadzeniem częściowo zdegradowanych glikoaminoglikanów (GAGs). Choroba Sanfilippo jest klasyfikowana jako MPS typu III i spowodowana jest czterema defektami genetycznymi, które determinują podtypy A, B, C i D. W każdym podtypie MPS III, podstawowym spichrzanym GAG jest siarczan heparanu (HS), jednak mutacje prowadzące do podtypów A, B, C i D są zlokalizowane w genach kodujących sulfatazę-N-heparanu (gen *SGSH*), alfa-N-acetylo-glukozaminidazę (gen *NAGLU*), acylotransfazę acetylo-CoA:alfa-glukozaminid (gen *HGSNAT*) i 6-sulfatazę-N-acetyloglukozoaminy (gen *GNS*). Zmiany neurodegeneracyjne w ośrodkowym układzie nerwowym są głównym problemem w przypadku choroby Sanfilippo. Powodują one dotkliwe uszkodzenia procesów poznawczych oraz behawioralnych. Jest to główna przyczyna aktualnego braku terapii dla pacjentów chorujących na MPS typu III. Pacjenci chorujący na pozostałe typy MPS (I, II, IVA i VI) mogą być leczeni przy zastosowaniu enzymatycznej terapii zastępczej, przeszczepu szpiku kostnego lub hematopoetycznych komórek macierzystych. Mimo, iż nie ma jeszcze dostępnej terapii dla choroby Sanfilippo, badania przeprowadzone w ostatnich latach przyniosły wyniki dające nadzieję na odnalezienie skutecznej terapii. Aktualnie przeprowadzane są badania kliniczne dla terapii genowej, enzymatycznej terapii zastępczej oraz terapii redukcji substratu. Te ostatnie osiągnięcia są przedstawione oraz przedyskutowane w poniższym artykule.*

Choroba Sanfilippo – krótki opis

MPS typu III, zwana chorobą Sanfilippo, spowodowana jest mutacją 4 różnych genów. Geny te kodują różne enzymy biorące udział w degradacji siarczanu heparanu (HS), jednego z GAG. Dlatego też, jeżeli mutacje występują w obu allelach jednego z tych genów (każdy podtyp choroby Sanfilippo jest dziedziczony w sposób autosomalny i recesywny), HS nadmiernie gromadzi się w lizosomach, powodując główną przyczynę choroby. 4 podtypy choroby Sanfilippo – MPS III A, MPS III B, MPS III C i MPS III D rozróżnianie są zależnie od dysfunkcji konkretnych genów i ich produktów. Są one skutkiem mutacji w genie *SGSH* kodującym sulfatazę-N-heparanu, *NAGLU* kodującym alfa-N-acetylo-glukozaminidazę, *HGSNAT* kodującym acylotransfazę acetylo-CoA:alfa-glukozaminid oraz *GNS* kodującym 6-sulfatazę

N acetyloglukozoaminy. Patomechanizm i cechy charakteryzujące chorobę Sanfilippo zostały ostatnio opisane w kilku pracach przeglądowych (Andrade *et al.* 2015; Fedele 2015; Jakobkiewicz-Banecka *et al.* 2016).

Niezależnie od podtypu, wszystkie osoby cierpiące na chorobę Sanfilippo wykazują podobne symptomy, jednak ich dotkliwość i czas występowania mogą się znacznie różnić pomiędzy pacjentami. W odróżnieniu od innych typów MPS, w których pojawiają się wyjątkowo ciężkie symptomy somatyczne, większość problemów klinicznych MPS III wywodzi się z defektów procesów poznawczych oraz dysfunkcji neurologicznych. Mimo iż występują one także w innych typach MPS, podejrzewa się, że dysfunkcja ośrodkowego układu nerwowego jest najbardziej dotkliwa w przypadku choroby Sanfilippo. Symptomy występują zazwyczaj w wieku od kilku miesięcy do kilku lat i charakteryzują się opóźnieniem w rozwoju, spadkiem zdolności poznawczych, hiperaktywnością, zaburzeniami snu, agresywnym zachowaniem oraz drgawkami. W późnej fazie choroby zanika hiperaktywność oraz stany lękowe, lecz pacjenci tracą możliwość poruszania się i słabo reagują na impulsy z zewnątrz. Długość życia pacjentów waha się pomiędzy dwiema i trzema dekadami (więcej informacji dostępnych w publikacjach: Andrade *et al.* 2015; Fedele 2015; Jakobkiewicz-Banecka *et al.* 2016).

Rozwój terapii dla choroby Sanfilippo

Ze względu na to, że większość problemów klinicznych występujących w MPS typu III związanych jest z dysfunkcjami ośrodkowego układu nerwowego, rozwój efektywnych terapii jest znacznie utrudniony. W innych typach MPS, gdzie pojawiają się dotkliwe objawy somatyczne, leczenie możliwe jest przy użyciu enzymatycznej terapii zastępczej (ERT) lub przeszczepu komórek macierzystych (albo szpiku kostnego) (HSCT). Dzięki temu możliwe jest zwalczanie różnych objawów spowodowanych przez chorobę (Giugliani *et al.*, 2016). Jednakże, mimo iż odpowiedni enzym może być dostarczany do krwi pacjentów dotkniętych MPS typu III, nie może on skutecznie przejść bariery pomiędzy krwią a mózgiem. W wyniku tego, niemożliwością jest osiągnięcie pożądanego efektu terapeutycznego.

Pomimo problemów opisanych powyżej, w ostatnich latach opublikowano wiele prac, w których opisano ogromny postęp w poszukiwaniu terapii dla pacjentów cierpiących na chorobę Sanfilippo. Rozróżnia się trzy grupy potencjalnych terapii: zmodyfikowaną ERT (w której enzym połączony jest z nośnikiem, który jest w stanie przekroczyć barierę pomiędzy krwią a mózgiem, lub podawany jest bezpośrednio do centralnego układu nerwowego), terapię genową oraz terapię bazującą na małych cząsteczkach. Co ważne, oprócz badań na komórkowych i zwierzęcych modelach MPS III, badania kliniczne zostały rozpoczęte z wykorzystaniem wszystkich trzech grup potencjalnych terapii. Mimo, iż żadna z terapii nie została jeszcze oficjalnie zarejestrowana wydaje się, iż jesteśmy bardzo blisko odkrycia skutecznej terapii dla choroby Sanfilippo. W tym artykule, wspomniane powyżej odkrycia zostaną podsumowane i przedyskutowane, z naciskiem na możliwości znalezienia efektywnego sposobu leczenia. Przegląd ten skupia się na artykułach opublikowanych w ciągu ubiegłych trzech lat, gdyż poprzednie prace zostały już omówione w innych przeglądach oraz dlatego, że w tym okresie dokonano najbardziej przełomowych odkryć.

Warto wspomnieć, że w związku ze specyficznymi problemami klinicznymi występującymi w przypadku choroby Sanfilippo, bardzo trudno jest ustalić niedwuznaczne testy, które mogłyby być użyte w badaniach klinicznych w celu określenia wydajności testowanych terapii. Problem ten jest jeszcze bardziej istotny ze względu na fakt, iż MPS typu III jest rzadką chorobą (wskaźnik rozpowszechnienia szacowany jest pomiędzy 0,3 i 4,1 przypadków na 100.000

urodzeń; Valstar *et al.*, 2008), dlatego też testy kliniczne biorą pod uwagę relatywnie małą liczbę pacjentów. W związku z tym, konkretne rekomendacje dla projektowania badań klinicznych terapii dla choroby Sanfilippo zostały ostatnio ustalone przez grupę ekspertów (Ghosh *et al.*, 2017).

Ostatnie badania na modelach komórkowych MPS typu III

Modele komórkowe chorób genetycznych dostarczają możliwość efektywnej oceny mechanizmów molekularnych testowanych procesów oraz wydajności terapeutyków. Mimo, iż badania na takich modelach nie oddają w pełni możliwych reakcji organizmu ludzkiego na testowane związki, są dobrą podstawą do testów przed-klinicznych oraz oceny specyficznych mechanizmów według których testowane związki działają w komórce. Ostatnie badania opisujące wyniki eksperymentów z komórkowym modelem choroby Sanfilippo dostarczają ważnych informacji, tym samym ułatwiając rozwój ERT, terapii redukcji substratu i innych terapii bazujących na małych cząsteczkach.

Enzymatyczna terapia zastępcza

Głównym problemem w przypadku zastosowania ERT przy chorobie Sanfilippo jest brak możliwości efektywnego przekroczenia bariery pomiędzy krwią a mózgiem przez rekombinowany enzym. Co więcej, dodatkowy problem w przypadku MPS typu III B to brak odpowiedniej fosforylacji mannozy w pozycji 6 prowadzący do słabego wychwytu rekombinowanej ludzkiej alfa N acetyloglukozaminidazy (rhNAGLU) przez komórki. W celu obejścia tego problemu, Kan *et al.* (2014) skonstruowali enzym rhNAGLU przyłączony do fragmentu insulinopodobnego czynnika wzrostu 2 (IGF-II), odpowiedzialnego za wiązanie z receptorem IGF-II. Dlatego też, takie białko fuzyjne powinno być w stanie wnikać do komórki przy użyciu receptora IGF-II. Faktycznie pokazano, że białko fuzyjne zostało efektywnie przetransportowane do środka komórek MPS typu IIIB. Co więcej, białko to zachowało właściwości alfa N acetyloglukozaminidazy i było w stanie zmniejszyć ilość HS w fibroblastach MPS IIIB do poziomu zbliżonego do obserwowanego w komórkach kontrolnych.

Powyższe wyniki wykazują, że fuzja danego enzymu z fragmentem IGF II wiążącym receptor daje możliwość pokonania problemu, jaką stanowi mała wydajność dostarczania enzymu w przypadku braku wydajności fosforylacji mannozy w pozycji 6. Jednakże, w celu rozwinięcia ERT dla MPS IIIB, kolejny problem, jakim jest niska wydajność przechodzenia bariery między krwią a mózgiem, powinien zostać pokonany.

Terapia redukcji substratu

Celem terapii redukcji substratu jest obniżenie wydajności syntezy związków, które nie mogą być efektywnie zdegradowane, dlatego też polega na przywróceniu równowagi w ich metabolizmie. W tym świetle, SRT dla MPS bazuje na redukcji syntezy GAG. Badania pokazują, że jedną z możliwości jest wyciszenie ekspresji genów kodujących enzymy biorące udział w syntezie GAG (Dziedzic *et al.*, 2010; Kaidonis *et al.*, 2010). Przykładem może być zastosowanie siRNA do wyciszenia genów *XYLT1*, *XYLT2*, *GALTI* i *GALTI* (Dziedzic *et al.*, 2010) oraz shRNA do wyciszenia *EXTL2* i *EXTL3* (Kaidonis *et al.*, 2010), dzięki którym udało się efektywnie zredukować syntezę GAG i zmniejszyć magazynowanie HS w MPS IIIA. W najnowszych raportach pokazuje się, że wydajność wyciszania *EXTL2* oraz *EXTL3* przez siRNA wpływa na zmniejszenie wydajności syntezy i mniejszą akumulację GAG w fibroblastach MPS IIIC (Canals *et al.*, 2015). Pomimo iż wyniki te są przewidywalne, bazując na poprzednich badaniach

(przeprowadzone przez Dziedzic *et al.*, 2010 oraz Kaidonis *et al.*, 2010), istotne jest udowodnienie, że strategia SRT bazująca na wyciszaniu genów jest efektywna w przypadku różnych podtypów choroby Sanfilippo. Z drugiej strony, mimo zachęcających wyników otrzymanych podczas eksperymentów na hodowlach komórkowych, wyciszanie genów za pomocą siRNA zostaje tylko domniemaną terapią dla MPS typu III, dopóki nie zostanie odkryta bardziej wydajna metoda dostarczania terapeutyków do centralnego układu nerwowego.

Innym sposobem redukcji syntezy GAG jest inhibicja transdukcji sygnału zależnej od naskórkowego czynnika wzrostowego (Jakobkiewicz-Banecka *et al.*, 2009). Może to zostać osiągnięte przy użyciu genisteiny, naturalnego izoflawonu, która jest w stanie częściowo zahamować produkcję GAG i znacząco zredukować magazynowanie GAG w różnych typach MPS (Piotrkowska *et al.*, 2006). Ostatnio wynaleziony został pewien rodzaj SRT, zwany ukierunkowaną na ekspresję genów terapią izoflawonową. Opiera się on na użyciu genisteiny. Został przetestowany na komórkowych oraz zwierzęcych modelach MPS IIIA oraz MPS IIIB. Pilotażowe badania kliniczne również zostały już przeprowadzone (opisano je w pracy przeglądowej Wegrzyn, 2012). Dalsze badania nad tą terapią opisane zostały poniżej, w rozdziale poświęconym badaniom klinicznym.

Dzięki ostatnim badaniom przeprowadzonym przez Fumie *et al.* (2017) udało się uzyskać oczyszczony i wysoce aktywny ekstrakt flawonoidowy z *Medicago sativa*. Autorzy potwierdzili, że czysta genisteina jest skuteczna w redukowaniu poziomów GAG w komórkach MPS typu III (konkretne podtypy choroby Sanfilippo nie zostały wyróżnione). Genisteina wykazała również podobną do ekstraktu flawonoidowego aktywność (lecz o 25% niższą). Dlatego też, wyniki te dostarczają dowodów dla wydajności ukierunkowanej na ekspresję genów terapii izoflawonowej w redukowaniu poziomów GAG w chorobie Sanfilippo. Dalsze badania mogą wskazać jaka kompozycja flawonoidów jest optymalna dla zmiany fenotypu choroby.

Inne terapie oparte na użyciu małych cząsteczek

Mimo, iż biosynteza koenzymu Q10 nie jest zmieniona w komórkach MPS, udowodniono, że jego poziom podstawowy jest zmniejszony w fibroblastach MPS typu IIIA (Matalonga *et al.*, 2014). Związek ten został użyty razem z koktajlem antyoksydantów w celu leczenia fibroblastów MPS IIIA oraz IIIB. Co ciekawe, komórki MPS IIIB traktowane przy użyciu CoQ10, wykazały wzrost aktywności alfa-N-acetyloglukozaminidazy, podczas gdy nie wykryto znaczących zmian w aktywności w sulfatazy N heparanu podczas analogicznego eksperymentu przy użyciu fibroblastów MPS IIIA. W niektórych liniach fibroblastów MPS IIIA oraz MPS IIIB, zwłaszcza tych wykazujących podwyższoną egzocytozę, również zaobserwowano redukcję w akumulacji GAG (Matalonga *et al.*, 2014). Wyniki te zachęcają do wzięcia suplementacji CoQ10 pod uwagę jako procedury, która może wspomóc leczenie choroby Sanfilippo.

W MPS IIIC, znaczna proporcja (około 20%) znanych mutacji wpływa na składanie RNA (ang. *splicing*). Mutacje te zlokalizowane są na końcach egzonów, dlatego też możliwe jest rozważenie procesu składania RNA jako celu dla potencjalnej opcji terapeutycznej. W celu przywrócenia normalnego przetwarzania RNA w komórkach posiadających takie mutacje, zostały użyte specjalnie zmienione U1 snRNAzy (Matos *et al.*, 2014). Innym rozwiązaniem, które zostało wykorzystane jest użycie glukozaminy jako potencjalnej cząsteczki towarzyszącej w celu aktywowania zmutowanego białka, które jest produktem genu niosącego mutacje skutkujące skróceniem acylotransfazy acetylo-CoA:alfa-glukozaminid o 4 aminokwasy (Matos *et al.*, 2014). Obie strategię wydają się być skuteczne w osiągnięciu chociaż częściowej poprawy aktywności acylotransfazy acetylo-CoA:alfa-glukozaminid. Wyniki te mogą być początkiem dla dalszej pracy nad rozwinięciem terapii dla pacjentów z chorobą Sanfilippo

posiadających specyficzne mutacje na końcach egzonów. Niemniej jednak, wydajne dostarczanie terapeutycznych cząsteczek RNA do centralnego ośrodka nerwowego musi zostać zapewnione, co będzie stanowiło przeszkodę w tym rodzaju terapii.

Kiedy choroba jest spowodowana mutacją typu non-sens, potencjalnie skuteczna jest strategia wykorzystania odczytywania stop kodonu. Metoda ta opiera się na użyciu związków, które są w stanie modyfikować aktywność rybosomów w taki sposób, aby kodony stop nie były poprawnie rozpoznawane. Inne związki, zarówno amino-glikozydy (gentamicyna oraz geneticyna) oraz związki nie-amino-glikozydowe (PTC124, RTC13, RTC14, BZ6 oraz BZ16) zostały użyte w celu leczenia komórek otrzymanych z różnych lizosomalnych chorób spichrzeniowych (Gomez-Grau *et al.*, 2015). Mimo, że w przypadku innych chorób (MPS IV, choroby Niemann-Pick'a typu A oraz B) strategia ta była skuteczna w częściowym przywróceniu deficytu aktywności enzymu, przynajmniej przez niektóre testowane związki, nie zaobserwowano pozytywnych efektów w komórkowych modelach MPS IIIB oraz MPS IIIC. Dlatego też, ta strategia terapeutyczna wydaje się nie być skuteczna w przypadku choroby Sanfilippo, a przynajmniej wtedy, kiedy wykorzystywane są związki testowane przez Gomez-Grau *et al.* (2015).

Ostatnie badania na zwierzęcych modelach MPS III

Zwierzęce modele chorób genetycznych dają możliwość testowania potencjalnych terapii, których wydajność potwierdzona została w badaniach *in vitro*. Ten etap rozwoju terapii poświęcony jest testowaniu efektów potencjalnych leków na cały organizm, a nie tylko na komórki.

Wykorzystanie komórek jednojądrzastych z pępowiny

Biorąc pod uwagę wiele nieudanych prób podjęcia terapii, przypuszcza się, że przeszczep szpiku kostnego oraz transplantacja hematopoetycznych komórek macierzystych nie są skuteczne w przypadku leczenia choroby Sanfilippo (Giugliani *et al.*, 2016, Jakobkiewicz-Banecka *et al.*, 2016). Niemniej jednak, ostatnie badania wykazały pozytywne efekty wykorzystania ludzkich komórek jednojądrzastych pochodzących z pępowiny w mysim modelu MPS IIIB (Willing *et al.*, 2014). Komórki zostały podane dożylnie i w przypadku, gdy procedura była powtarzana co miesiąc przez okres pół roku, zachowania lękowe zostały częściowo wyeliminowane. W dodatku, w mózgach myszy, które podane zostały terapii, akumulacja gangliozydów i aktywacja mikrogleju zostały zmniejszone, a także odpowiednia budowa cytoszkieletu została przywrócona w hippokampie (Willin *et al.*, 2014). Wyniki te sugerują, że podanie zdrowych komórek jednojądrzastych z pępowiny może być potencjalną terapią dla choroby Sanfilippo, mimo poprzedniego braku sukcesu przy użyciu innych terapii opierających się na komórkach. Teoria ta poparta jest wynikami badań na myszach MPS IIIA, podczas których zademonstrowano poprawę funkcjonowania ośrodkowego układu nerwowego po hematopoetycznej transplatacji komórek macierzystych eksprymujących gen *SGSH* dostarczony przez zmodyfikowane wektory lentiwirusowe (Sergijenko *et al.* 2013).

Enzymatyczna terapia zastępcza

Ze względu na to, iż ośrodkowy układ nerwowy jest głównym miejscem zaatakowanym przez chorobę Sanfilippo, użycie ERT stanowi poważny problem. W celu terapii, enzym jest dostarczany dożylnie, ale problemem jest niewydajne przechodzenie przez barierę między krwią a mózgiem przez rekombinowane białko. Dlatego też zostało podjętych wiele prób w celu wyeliminowania tego ograniczenia.

Jedną z potencjalnych metod dostarczania dożylnie podanego enzymu terapeutycznego do mózgu jest jego fuzja z innym białkiem, które jest w stanie przekroczyć barierę między krwią, a mózgiem. Pomysł ten został wykorzystany przez grupę badawczą Boado *et al.*, (2014), którzy skonstruowali fuzję N-sulfatazy heparanu z przeciwciałem monoklonalnym przeciw ludzkim receptorom insuliny. Po dożylnym podaniu białka fuzyjnego małpie *Rhesus*, możliwe jest wykrycie około 1% tego białka w mózgu. Rekombinowane białko zachowuje swoją aktywność enzymatyczną, co daje mu możliwość redukcji magazynowania GAG w fibroblastach MPS IIIA (Boado *et al.*, 2014). Analogiczny eksperyment został wykonany przy użyciu alfa-N-acetylo-glukozaminidazy i komórek MPS IIIB, a wyniki badań na małpach *Rhesus* oraz fibroblastach były bardzo podobne (Boado *et al.*, 2016). Dlatego też, strategia białka fuzyjnego wydaje się być potencjalnie skuteczna w różnych podtypach choroby Sanfilippo. Warto wspomnieć, że białko fuzyjne podawane dożylnie zostało już poddane testom klinicznym z innym typem MPS, zespołem Hurler (MPS I) i leczenie wykazało pozytywne skutki. Próby kliniczne są wciąż w toku (Giugliani *et al.*, 2017).

Inną możliwością dostarczania enzymu do mózgu jest ich bezpośrednie podanie do ośrodkowego układu nerwowego. Rekombinowana sulfataza N heparanu była dostarczana do płynu mózgowo-rdzeniowego przez zbiornik mózdkowo-rdzeniowy w psim modelu MPS IIIA (King *et al.*, 2015). W płynie mózgowo rdzeniowym oraz korze mózgowej zaobserwowano spadek poziomów HS. Niemniej jednak, relatywnie duża dawka enzymu jest potrzebna to normalizacji biomarkerów powiązanych z MPS III (King *et al.*, 2015). Inne badania przedstawiają różne ścieżki podawania enzymu do płynu mózgowo-rdzeniowego. Ludzka rekombinowana sulfataza N heparanu została podana myszom MPS IIIA dokanałowo lędźwiowo, cysterniowo oraz dożylnie (Beard *et al.*, 2015). Infuzja lędźwiowa nie przyniosła oczekiwanego rezultatu (słaba dostarczalność enzymu oraz brak znaczącej redukcji poziomów GAG), jednakże, docysternowe podanie enzymu, mimo iż było najbardziej inwazyjne, okazało się być najbardziej skuteczne w redukowaniu poziomów GAG oraz redukcji aktywności mikrogleju (Beard *et al.*, 2015). W kolejnym badaniu, ta sama grupa badawcza zmodyfikowała procedurę podawania enzymu, podczas której każdemu ze zwierząt wszczepiono kaniulę dokomorową połączoną z podskórną pompą mini-osmotyczną przez którą podawana była sulfataza N heparanu (King *et al.*, 2016b). Metoda ta umożliwiła ciągłe podawanie małej dawki enzymu do ośrodkowego układu nerwowego, jednakże efekty terapeutyczne polegały na częściowej redukcji pierwotnego magazynowania HS i wtórnego magazynowania gangliozydów w mózgu oraz małej redukcji mikro- (ale nie astro-) glejozy (King *et al.* 2016b). Z drugiej strony, ta metoda podawania enzymu jest sukcesywnie ulepszana poprzez wszczepianie podskórnych mini-pomp osmotycznych podłączonych do kaniuli dokomorowych skierowanych na prawą komorę boczną (King *et al.* 2016a). W myszach MPS IIIA leczonych sulfatazą N heparanu, poziom HS prawie wrócił do normy a ilość gangliozydów uległa znacznemu spadkowi (King *et al.*, 2016a).

Połączenie dwóch metod opisanych powyżej, konstruowania białka fuzyjnego oraz bezpośredniego podania enzymu do ośrodkowego układu nerwowego zostało wykorzystane w ostatnich badaniach (Aoyagi-Scharber *et al.*, 2017). Ludzka alfa-N-acetylo-glukoaminidaza została połączona z insulinopodobnym czynnikiem wzrostu 2 (który zapewnia wydajniejsze dostarczanie do lizosomów) i została podana do komórek mózgowych myszy MPS IIIB. W mózgu zanotowano rozległą lokalizację białka fuzyjnego oraz normalizację poziomów HS i zmniejszenie magazynowania wtórnego (Aoyagi-Scharber *et al.*, 2017).

Podsumowując, zarówno strategia fuzji białka oraz bezpośredniego podania enzymu do ośrodkowego układu nerwowego są w stanie zredukować biomarkery w zwierzęcych

modelach choroby Sanfilippo. Użycie enzymu połączonych z peptydem zapewnia efektywne dostarczenie go do mózgu i jest obiecującą opcją terapii. Jednakże, w przypadku dożylnego podawania enzymu, jego dawki muszą być odpowiednio duże. Problem ten może zostać wyeliminowany poprzez infuzję enzymu do ośrodkowego układu nerwowego. Sposób ten jest jednak inwazyjną procedurą, która może stwarzać problemy w wypadku leczenia hiperaktywnych oraz niewspółpracujących z lekarzami, ze względu na objawy choroby, dzieci cierpiących na chorobę Sanfilippo.

Terapia genowa

Terapia genowa przez długi czas uważana była za dużą nadzieję dla pacjentów cierpiących na choroby genetyczne. Jednakże, wiele lat badań wykazało, że istnieje wiele różnorodnych i istotnych problemów, które muszą być rozwiązane przed rozpoczęciem właściwej terapii. Badania z ostatnich lat wykazały, że jest to możliwe, dzięki użyciu zwierzęcych modeli choroby Sanfilippo.

Wybór odpowiedniego wektora dla terapii genowej wydaje się być najbardziej istotnym czynnikiem decydującym o dalszym powodzeniu terapii. Heldermon *et al.*, (2013) zaproponowali podanie nie jednego, lecz dwóch różnych wektorów wirusowych, niosących zrekombinowany gen *NAGLU* w celu leczenia myszy MPS IIIB. Jako wektory użyte zostały adeno-wirus 2/5 (AAV2/5) i lentiwirus. W badaniach porównano łączoną terapię z terapią pojedynczym wektorem. Wyniki wykazały, że najbardziej skuteczna jest terapia łączona. Oprócz poprawy czynników biochemicznych i histologicznych, leczone zwierzęta żyły zdecydowanie dłużej i wykazały poprawę w testach behawioralnych, w porównaniu do grupy kontrolnej (Heldermon *et al.*, 2013). Nawet pośród wektorów AAV, różne serotypy wirusa mogą mieć różny wpływ podczas podania ich do organizmu. Dlatego też, 4 wektory AAV niosące gen *NAGLU*, wywodzące się z AAV5, AAV8, AAV9 i AAVrh10, zostały przetestowane na mysim modelu MPS IIIB (Gilkes *et al.*, 2016). Niemniej jednak, trzeba wziąć pod uwagę, że skutki widoczne w zwierzęcym modelu choroby Sanfilippo, mogą znacznie odbiegać od skutków, które wystąpiłyby u prawdziwych pacjentów.

Jednym z większych problemów zastosowania terapii genowej w przypadku chorób neurodegeneracyjnych jest wydajne dostarczenie genu terapeutycznego do neuronów w mózgu. Pojawia się więc pytanie - czy wirusy dostarczane dożylnie mogą zainfekować neurony w mózgu i czy bezpośrednio podanie wektora do mózgu jest bezpieczne? Zmodyfikowany wektor AAV9 niosący gen *NAGLU*, został użyty w celu leczenia małp makaków (Murrey *et al.*, 2014). Wirusy były podawane poprzez zastrzyk dożylny. Najważniejsze wyniki tych eksperymentów wykazały, że procedura ta jest bezpieczna i że enzym jest odpowiednio dostarczany do ośrodkowego układu nerwowego (Murrey *et al.*, 2014). Bezpośrednie podanie wektorów AAV9 z *NAGLU* do płynu rdzeniowo-mózgowego u myszy MPS IIIB zostało wykonane w badaniach prowadzonych przez Ribera *et al.*, (2015). Poziom GAG został znormalizowany, a objawy choroby uległy znacznej redukcji w przypadku leczonych zwierząt, potwierdzając bezpieczeństwo zastosowania tej procedury (Ribera *et al.*, 2015). Systematyczne dostarczanie innego wektora, rAAV9-CMV-hNAGLU skonstruowanego do transdukcji genu *NAGLU*, również zostało uznane za bezpieczną i efektywną metodę w przypadku leczenia myszy MPS IIIB (Meadows *et al.*, 2015). Bardziej szczegółowe badania z użyciem wektora wskazują, że po dożylnym podaniu wirusów myszom MPS IIIB następuje prawie całkowita korekcja poziomu różnych metabolitów (Fu *et al.*, 2017). Wyniki te są szczególnie obiecujące w świetle rozwoju terapii dla pacjentów chorujących na chorobę

Sanfilippo. Z drugiej strony, podanie 4 różnych wektorów AAV niosących *NAGLU* do podwzgórza sugeruje, że ten sposób dostarczania genu terapeutycznego do mózgu myszy MPSIIIB ma ograniczoną wydajność (Gilkes *et al.* 2013), sugerując że podobna strategia nie przyniosłaby oczekiwanych rezultatów w przypadku ludzi.

Wnioskując z powyższego opisu oraz rozważań można stwierdzić, że większość ostatnich badań na modelach zwierzęcych w przypadku terapii genowej dla choroby Sanfilippo skupia się na podtypie MPS IIIB. Mimo tego, dwa inne podtypy również zostały przebadane. Myszy MPS IIIA były leczone przy użyciu dwóch wektorów lentiwirusowych niosących geny kodujące mysią N-sulfatazę heparanu i czynnik modyfikujący sulfatazę (McIntyre *et al.*, 2014). Po bezpośrednim podaniu do komór bocznych mózgowych wykryto efektywną ekspresję enzymu terapeutycznego w mózgu (aktywność pomiędzy 0.5- i 4 razy taka jaką zaobserwowano u normalnych myszy) oraz poprawę zarówno biochemiczną, jak i behawioralną (McIntyre *et al.*, 2014). W innym badaniu testowano efekty podawania śródmiąższowego AAVrh10 wektora eksprymującego gen *SGSH* w mysim modelu MPS IIIA (Winner *et al.*, 2016). Mimo pozytywnych zmian w różnych markerach biochemicznych znalezionych w mózgu leczonych zwierząt, które zostały zaobserwowane w regionach zlokalizowanych blisko miejsca podania enzymu, nie zaobserwowano podobnych zmian w miejscach oddalonych od regionu nakłucia, lub tych, które z takim miejscem nie były powiązane (Winner *et al.*, 2016). Dlatego też, w celu osiągnięcia satysfakcjonującej wydajności możliwe, iż istniała by potrzeba wielu zastrzyków. Problem ten stawia pod znakiem zapytania bezpieczeństwo tej metody. Najnowsze badania opisują pierwszą próbę testowania terapii genowej w nowym modelu zwierzęcym MPS IIID (Roca *et al.*, 2017). Po podaniu wektora AAV9 niosącego gen *GNS* do płynu mózgowo-rdzeniowego myszy MPS IIID, udało się uzyskać szczególnie obiecujące wyniki – normalizację magazynowania GAG, redukcję zapalenia nerwowego oraz poprawę zachowania. Co więcej, długość życia leczonych zwierząt została znacznie wydłużona w porównaniu do nieleczonych myszy (Roca *et al.*, 2017).

Podsumowując ostatecznie badania nad terapią genową dla choroby Sanfilippo przy użyciu modeli zwierzęcych, można ocenić, że dokonano ogromnego postępu w badaniach nad efektywnym dostarczaniem wektorów wirusowych i uzyskaniem poprawy parametrów biochemicznych w mózgu leczonych myszy oraz poprawę ich zachowania. Pozostaje problem wybrania optymalnej metody dostarczenia wektorów wirusowych, biorąc pod uwagę wydajność i bezpieczeństwo takiej procedury. W celu rozwiązania problemu, parametry powinny być odpowiednio dobrane, biorąc pod uwagę symptomy choroby Sanfilippo, takie jak hiperaktywność, bardzo ograniczony lub brak kontaktu werbalnego i zwiększone ryzyko podczas procedur znieczulających.

Testy kliniczne

Mimo iż testy kliniczne dla różnych typów MPS są wykonywane od prawie 20 lat (opisane zostały w przeglądzie Giugliani *et al.*, 2016) aż do niedawna żadne z testów nie były prowadzone dla choroby Sanfilippo. Głównym powodem jest trudność w rozwoju terapii efektywnej w redukcji podstawowej przyczyny choroby, magazynowania GAG w mózgu. Na szczęście, opierając się na obszernych badaniach wykonywanych przy użyciu modeli komórkowych i zwierzęcych, testy kliniczne zostały zgłoszone lub rozpoczęły się na przestrzeni ostatnich lat. Obejmują one przeszczep komórek macierzystych, enzymatyczną terapię zastępczą, terapię redukcji substratu oraz terapię genową.

Terapie oparte na transplantacji komórek

Mimo, iż poprzednie badania wykazały, że przeszczep komórkowy nie jest skuteczną metodą leczenia choroby Sanfilippo (opisane zostały w przeglądzie Giugliani *et al.*, 2016 oraz Jakobkiewicz-Banecka *et al.*, 2016), zostały podjęte próby oceny wydajności terapii komórkowych dla tej choroby. Duże badanie, w którym uczestniczyło 62 pacjentów MPS, zostało wykonane przy użyciu przeszczepu komórek hematopoetycznych (Aldenhoven *et al.*, 2015). Wyniki sugerują bezpieczne i wydajne usunięcie objaw MPS. Jednakże, spośród 62 pacjentów biorących udział w tym badaniu, jedynie 2 cierpiało na chorobę Sanfilippo. Dlatego też, biorąc pod uwagę wyniki przeszczepu komórek hematopoetycznych w przypadku MPS III, wyniki przedstawione przez Aldenhoven *et al.*, (2015) pozostają niespójne.

W innym doświadczeniu, wykonano przeszczep komórek macierzystych z pępowiny u dwóch pacjentów chorujących na chorobę Sanfilippo (jeden z podtypem MPS IIIA i drugi z MPS IIIB). Procedurę wykonano przed pojawieniem się symptomów choroby (Welling *et al.*, 2015). Pacjenci byli poddani obserwacji przez okres 5 lat. Niemniej jednak, pogarszanie się objawów neurologicznych, regres procesów poznawczych i zaburzenia zachowania rozwinęły się u tych pacjentów, pomimo udanego przeszczepu (Welling *et al.*, 2015). Dlatego też można wywnioskować, że podobnie jak w przypadku przeszczepu szpiku kostnego, terapie oparte na transplatacji komórek nie będą skuteczne w przypadku choroby Sanfilippo.

Enzymatyczna terapia zastępcza

Wyniki badań na modelach zwierzęcych oraz komórkowych (podsumowane w poprzednich rozdziałach) zachęciły naukowców do rozpoczęcia testów klinicznych z użyciem ERT dla MPS IIIA. W tym badaniu otwartym, rekombinowana ludzka sulfataza N heparanu była podawana podskórnie 12 pacjentom co miesiąc przez pół roku (Jones *et al.*, 2016). Metoda ta zdawała się być bezpieczna, jednak u wszystkich pacjentów odnotowano mniej lub bardziej dotkliwe efekty niepożądane. Ważne jest, aby mieć na uwadze, że żadne z nich nie były bezpośrednio powiązane z rekombinowanym enzymem. Pomimo ewidentnej redukcji poziomu HS w płynie mózgowo-rdzeniowym, 4 z 12 pacjentów wykazało spadek w parametrach rozwoju, 6 pozostało w stanie stabilnym, a wyniki u pozostałych 2 osób były dwuznaczne (Jones *et al.*, 2016). Dlatego też, mimo pozornego bezpieczeństwa, ta metoda leczenia zdecydowanie wymaga dalszych badań w celu ustalenia jej efektywności. Główny problem stanowi ocena rezultatów w relatywnie małej grupie pacjentów (jest to problem niemożliwy do pokonania u pacjentów z rzadkimi chorobami, np. chorobą Sanfilippo), która reprezentuje bardzo różne etapy oraz nasilenie symptomów. Najnowsze zalecenia w projektowaniu testów klinicznych powinny niewątpliwie zostać wzięte pod uwagę w planowaniu dalszych badań w tym kierunku.

Terapia redukcji substratu

Jeden z rodzajów terapii redukcji substratu został zaproponowany i przetestowany na mysim oraz komórkowym modelu choroby. Terapia ta opiera się na użyciu genisteiny, naturalnego izoflawonu i powoduje obniżenie poziomu ekspresji genów kodujących enzymy powiązane z syntezą GAG. Wyniki badań przedklinicznych tej terapii, nazwanej ukierunkowaną na ekspresję genów terapią izoflawonową, zostały podsumowane we wcześniejszej publikacji (Wegrzyn 2012). Zachęcające wyniki tych badań doprowadziły do dalszych testów nad bezpieczeństwem podawania dużych dawek (150 mg/kg/na dzień) genisteiny (tylko taka dawka była wystarczająco efektywna w eksperymentach na mysim modelu MPS IIIB) u dzieci. Próby trwały 12 miesięcy i wykazały bardzo wysokie bezpieczeństwo podawania wysokich dawek genisteiny doustnie (Kim *et al.*, 2013). Dlatego też aktualnie wykonywana jest próba kliniczna 3 fazy, podwójnie zaślepiona, randomizowana, z kontrolą placebo, dotycząca

zastosowania wysokich dawek doustnych aglikonu genisteiny u pacjentów z chorobą Sanfilippo (Jakobkiewicz-Banecka *et al.*, 2016). Genisteina jest podawana doustnie przez 12 miesięcy w dawkach po 150 mg/kg na dzień. Poddanych badaniom jest 24 pacjentów z MPS typu III (podtypy A, B i C). Rezultatem badań będzie ocena spadku poziomu HS w płynie rdzeniowo-mózgowym po upływie 52 tygodni leczenia oraz testy biochemiczne (stężenie GAG w moczu, poziom HS w osoczu, badania neuro-fizjologiczne oraz aktygrafia). Zgodnie z protokołem, badanie to powinny zakończyć się w 2017 roku, dlatego też istnieje szansa, że wyniki będą dostępne w przeciągu kilku najbliższych miesięcy.

Mając na uwadze bezpieczeństwo stosowania genisteiny, trzeba pamiętać, że przy dużych dawkach (500 i 1000 mg/kg) izoflawonu podawanych zdrowym myszom zaobserwowano niepożądane skutki. Poziomy poszczególnych enzymów takich jak: aminotransferazy alaninowej, aminotransferazy asparaginianowej i aminotransferazy alkalicznej, były istotnie podniesione. Co więcej, odnotowano degenerację wątroby i wzrost poziomu stresu oksydacyjnego (Singh *et al.*, 2014). Podobne efekty nie zostały jednak zaobserwowane przy podawaniu mniejszych dawek (160 mg/kg dziennie lub mniej) myszom dzikiego typu oraz myszom MPS IIIB (Malinowska *et al.*, 2009, 2010). Z drugiej strony, podczas badań na myszach MPS I, u części myszy leczonych genisteiną w dawce 160 mg/kg dziennie, zaobserwowano zmniejszoną długość ciała, zmniejszoną długość kości udowej, przepuklinę mosznową oraz wodniak mosznowy (Kingma *et al.*, 2015). Dlatego też, izoflawon powinien być używany z ostrożnością, zwłaszcza w przypadku dużych dawek.

Terapia genowa

Terapia genowa wydają się być wielką nadzieją dla pacjentów z MPS, zwłaszcza tych, cierpiących na neurodegeneracyjne formy choroby. Badania nad terapiami są prowadzone dla różnych typów MPS (podsumowane przez Lau i Hemsley 2017). Jednakże, w tym przeglądzie skupimy się wyłącznie na testach klinicznych przeprowadzanych na pacjentach z chorobą Sanfilippo.

Pierwsza próba kliniczna z terapią genową dla choroby Sanfilippo została przeprowadzona przez Tardieu *et al.*, (2014). Wektor oparty na AAVrh, niosący geny kodujące sulfatazę N heparanu oraz czynnik modyfikujący sulfatazę 1, został wstrzyknięty do mózgu. Czterech pacjentów z MPS IIIA wzięło udział w otwartym badaniu fazy 1/2. Mimo bardzo inwazyjnej procedury podania wektora, leczenie zostało dobrze przyjęte przez organizmy pacjentów i nie wystąpiły żadne skutki uboczne związane z rekombinowanym enzymem. Wstępna ewaluacja wydajności leczenia była nieprzekonywująca, ponieważ wyniki różniły się znacznie między pacjentami. Na przykład, zanik mózgu został ustabilizowany w przypadku dwóch pacjentów, ale dalej pogarszał się u innych oraz u połowy pacjentów wystąpiła poprawa zachowania taka jak uwaga lub sen (Tardieu *et al.*, 2014). Dlatego też, nie można było jednoznacznie stwierdzić wydajności tej terapii przed podjęciem bardziej szczegółowych badań klinicznych.

Wyniki podobnego testu klinicznego fazy 1/2 z wektorem opartym na AAVrh, niosącym gen *NAGLU* zostały ostatnio opublikowane (Tardieu *et al.*, 2017). W tej otwartej próbie klinicznej wzięło udział 7 pacjentów cierpiących na MPS IIIB. Pacjenci otrzymali 16 iniekcji intraparenchymalnych wspomnianego powyżej wektora. Poziom bezpieczeństwa został zaakceptowany i rozwój neuro-poznawczy został polepszony w porównaniu do danych pozyskanych z opisu naturalnego przebiegu choroby. Ważny jest fakt, że najlepsze rezultaty zaobserwowano u najmłodszych pacjentów (Tardieu *et al.*, 2017), co sugeruje, że podobna terapia powinna być rozpoczęta relatywnie wcześnie dla uzyskania najlepszych rezultatów. Dalsze badania kliniczne są konieczne w celu oceny wydajności tej terapii.

Wnioski końcowe

Przez ostatnie lata opublikowano wiele istotnych badań w dziedzinie rozwoju terapii dla choroby Sanfilippo. Informacja ta jest istotna w świetle aktualnego braku zarejestrowanych procedur terapeutycznych dla tej choroby. Zanotowano ogromny postęp w zrozumieniu mechanizmów choroby i rozwoju metod leczenia. Eksperymenty na komórkowych i zwierzęcych modelach oraz wyniki pierwszych testów klinicznych (zarówno z bezpośrednim podaniem enzymu do ośrodkowego układu nerwowego, jak i konstruowaniem białka fuzyjnego składającego się z pożądanego enzymu i polipeptydu odpowiedzialnego za wydajne przechodzenie bariery pomiędzy krwią a mózgiem), terapia redukcji substratu (z użyciem genisteiny jako czynnika powodującego zmniejszony poziom ekspresji genów kodujących enzymy biorące udział w syntezie GAG, tym samym zwalniające ten proces) oraz terapia genowa (z wektorami podawanymi dożylnie lub bezpośrednio do ośrodkowego układu nerwowego) są najbardziej zaawansowanymi procedurami terapeutycznymi, które są aktualnie testowane w badaniach klinicznych. Można zadać sobie pytanie: jak daleko jesteśmy od odkrycia prawdziwych terapii dla choroby Sanfilippo? Z jednej strony rozpoczęcie testów klinicznych może sugerować, że rejestracja procedur leczenia dostępnych dla pacjentów z MPS III powinna być możliwa w przeciągu kilku lat. Z drugiej strony, mimo imponujących wyników badań nad różnymi terapiami na modelach zwierzęcych, do dzisiaj nie został opublikowany spektakularny lek w przypadku pacjentów cierpiących na chorobę Sanfilippo. Możliwe, że optymalizacja obecnie testowanych procedur terapeutycznych lub połączenie dwóch z nich dostarczy wystarczająco efektywnego lekarstwa by zniwelować większość, o ile nie wszystkie problemy kliniczne występujące w MPS III. Warto pamiętać, że istnieje dysproporcja w liczbie badań prowadzonych na różnych podtypach choroby Sanfilippo. Enzymatyczna terapia zastępcza i terapia genowa będą dostępne zdecydowanie szybciej dla MPS IIIA oraz MPS IIIB niż dla innych podtypów. Z drugiej strony, terapia redukcji substratu powinna być tak samo skuteczna dla wszystkich podtypów MPS III.

Podsumowując, obecny stan opublikowanych wyników badań nad terapiami dla choroby Sanfilippo jest przedstawiony w Tabeli 1. Warto podkreślić, że niektóre testy kliniczne dla MPS III aktualnie trwają i w ciągu najbliższych miesięcy i lat powinny się ukazać kolejne sukcesywne publikacje opisujące ich wyniki.