

23 Febbraio 2008

INCONTRO PKUINSIEME

**Nuove frontiere:
la terapia enzimatica**

Elisabetta Salvatici

Clinica Pediatrica, Ospedale San Paolo,
Università degli Studi di Milano

Nuovi sviluppi nella terapia delle malattie metaboliche ereditarie

Nel corso degli ultimi decenni sono state identificate numerose malattie ereditarie congenite, rare se considerate singolarmente ma complessivamente frequenti.

Per alcune malattie del metabolismo intermedio, caratterizzate dall'accumulo di metaboliti tossici, numerosi successi terapeutici sono stati raggiunti escludendo/riducendo l'apporto di specifici substrati e/o impiegando farmaci metabolicamente attivi.

Ad oggi il trattamento della fenilchetonuria consiste in una dietoterapia

- ad apporto basso e controllato di fenilalanina
- costituita da alimenti naturali di origine vegetale e prodotti ipoproteici
- complementata con miscele aminoacidiche prive di fenilalanina e arricchite in LCPUFA

Obiettivi della dietoterapia, che deve essere proseguita **ininterrottamente per tutta la vita**, sono:

- prevenire il RITARDO MENTALE
- assicurare un'ADEGUATA CRESCITA ed un NORMALE STILE DI VITA con BUONO STATO DI SALUTE fino all'età adulta

→ **approccio multidisciplinare!**

Nuovi sviluppi nella terapia delle malattie metaboliche ereditarie

Considerando che appare tuttora poco applicabile la strada della “terapia genica” per il trattamento dell’iperfenilalaninemia, nuovi approcci terapeutici sono attualmente rivolti all’utilizzo della terapia enzimatica attraverso due diverse modalità:

- 1) *enzyme replacement* dell’enzima PAH
- 2) *enzyme substitution* attraverso l’utilizzo dell’enzima PAL

in grado entrambi di determinare una riduzione dei livelli plasmatici di fenilalanina nei pazienti affetti da iperfenilalaninemia.

1. The enzyme replacement therapy (ERT): il PAH

- Gamez et al nel 2004 per primi hanno tentato di produrre una forma stabile e non immunogena dell'enzima PAH utilizzabile per la ERT.
- A tale scopo sono state elaborate in vitro **tre forme di PAH** (full-length, double truncated e bacterial PAH derivato da *Chromobacterium violaceum*).
- L'isolamento e la purificazione di questo enzima, con la sua complessa attività e la necessità funzionale di cofattori (BH4-DHPR), hanno purtroppo per ora rallentato la percorribilità di questa strada.

2. La terapia enzimatica sostitutiva

Cos'è?

- E' la somministrazione periodica dell'enzima deficitario nel tentativo di ridurre o prevenire l'accumulo del substrato, responsabile del quadro clinico di numerose patologie.

Da quando esiste?

- La sperimentazione clinica sull'uomo è stata avviata negli anni '90 per la malattia di Gaucher e nel 2000 per altre malattie lisosomiali (Malattia di Fabry, Malattia di Pompe, Mucopolisaccaridosi tipo I, Malattia di Niemann Pick tipo B).

The enzyme substitution therapy: il PAL

Una nuova potenziale possibilità terapeutica per l'iperfenilalaninemia, attualmente in fase di studio, consiste nella realizzazione di un enzima (**Phenylalanine Ammonia Liase = PAL**) in grado di convertire la fenilalanina in NH_3 + Acido Cinnamico.

Quest'ultimo, senza necessità di cofattori, legandosi alla glicina, viene convertito in acido ippurico ed eliminato con le urine.

Se paragonato al PAH, il PAL presenta maggiori vantaggi:

- non richiede cofattori per la degradazione della phe,
- il prodotto del suo catabolismo (il trans-cinnamato) ha una tossicità molto bassa ed assenza di effetti embriotossici negli studi sugli animali.

PAL: *Phenylalanine Ammonia Liase*

Questo enzima fu scoperto da un gruppo di ricerca britannico a metà degli anni Settanta.

E' largamente rappresentato nel regno vegetale ed in alcune specie di funghi e lieviti, ma anche prodotto da un batterio (*E. Coli*).

La prima pubblicazione relativa al suo utilizzo apparve su *Lancet* nel 1980: in tale articolo veniva dimostrato come in un paziente PKU non in dietoterapia i livelli plasmatici di fenilalanina si riducessero del 22% dopo l'assunzione orale per 12 giorni consecutivi di tavolette di PAL (purificato ed ottenuto dal lievito *R. Glutinis*).

PAL: Phenylalanine Ammonia Liase

In tale studio veniva però sottolineato che:

- il pH ottimale per l'attivazione del PAL è 8.0, valore molto vicino a quello medio del piccolo intestino
- il PAL viene inattivato molto rapidamente nel duodeno; pertanto per preservarne l'attività deve essere protetto dalla proteolisi intestinale

Pertanto sono necessari “accorgimenti” per proteggerlo dall'acidità gastrica e dall'azione delle proteasi pancreatiche.

PAL: Phenylalanine Ammonia Liase

Nel 1989 un gruppo di studio canadese dimostrò che il PAL era comunque in grado di sopravvivere nell'intestino per un tempo sufficiente a smaltire la fenilalanina assunta con gli alimenti.

Nel 1995 Sarkissian et al hanno descritto un metodo efficace e sicuro per la produzione di una forma di PAL "più resistente", dimostrandone l'efficacia in modelli animali (topi) affetti da PKU.

L'enzima utilizzato era contenuto all'interno di capsule in grado di preservarne l'attività anche durante il transito nell'intestino ("in vitro" risultava infatti resistente all'azione di chimotripsina e tripsina).

PAL: Phenylalanine Ammonia Liase

Nel 2005 (Mol. Genet. Metab.) Sarkissian et al hanno dimostrato come il PAL (derivato da E. Coli e non modificato) somministrato per via orale, fosse in grado di ridurre la concentrazione plasmatica di fenilalanina in topi affetti da PKU.

I primi studi condotti “in vivo” hanno dimostrato che l’assunzione per via orale di tali capsule per 30 giorni consecutivi determina una riduzione del $51.3 \pm 9.02\%$ della fenilalanina plasmatica già dopo 23 giorni.

PAL: *Phenylalanine Ammonia Liase*

Il PAL somministrato per via orale riduceva la concentrazione plasmatica di fenilalanina (phe) nei topi PKU del 31% dopo 1 ora e del 44% dopo 2 ore.

La riduzione dei livelli plasmatici di phe all'interno del range di 250-1000 umol/L è stata osservata però in 2 dei 4 topi trattati con PAL.

Pertanto:

sebbene questo trattamento abbia effetti promettenti è stato dimostrato che possiede *in vivo* una bassa specificità d'azione se paragonato all'attività *in vitro*.

PAL: Phenylalanine Ammonia Liase

Quindi, sebbene allettante la possibilità di somministrare il PAL per via orale, è stata progressivamente considerata una nuova modalità di somministrazione di tale enzima, ovvero la via parenterale.

Sarkissian and Gamez nel 2005 hanno dimostrato come la somministrazione sottocutanea di PAL (ancora in fase di studio per via intramuscolare, intraperitoneale ed endovenosa) determini una maggiore riduzione della concentrazione plasmatica e cerebrale di fenilalanina.

Purtoppo quest'ultimo effetto metabolico non si mantiene attraverso ripetute iniezioni, a causa delle notevoli proprietà immunogene del PAL.

Problemi aperti:

per la VIA ORALE:

- scarsa resistenza dell'enzima al ph acido dello stomaco
- bassa resistenza dell'enzima all'azione delle proteasi intestinali
- utilizzo in associazione ad una dieta controllata a modesto apporto proteico

per la VIA PARENTERALE:

(a causa dell'alta immunogenicità del PAL)

- breve emivita
- reazioni immunologiche indesiderate
- sviluppo di anticorpi diretti contro l'enzima, in risposta a ripetute somministrazioni

PEG-PAL: *PEGylated recombinant Phenylalanine Ammonia Liase*

Da Wang, Gamez, Sarkissian et al nel 2006 è stata quindi sperimentata una variante di tale enzima (derivato da *Rhodospiridium Toruloides*) modificato tramite tecniche di ingegneria molecolare (polietilene-glicosilazione -PEG) in grado di possedere:

- una maggiore specificità d'azione
- un'emivita prolungata
- una ridotta immunogenicità in vivo

PEG-PAL: *PEGylated recombinant Phenylalanine Ammonia Liase*

Studi pre-clinici sugli animali hanno dimostrato come questo enzima, somministrato per via sottocutanea per 12 settimane tramite iniezioni mono-settimanali, permetta di:

- ridurre i livelli plasmatici di fenilalanina al di sotto dei valori di normalità
- far regredire nel topo l'ipopigmentazione correlata alla malattia
- promuovere l'incremento ponderale del topo

Phenylalanine Ammonia Liase e sperimentazione clinica sull'uomo

- Il 27/11/2007 una casa farmaceutica americana (BioMarine) ha annunciato alla stampa di aver presentato alla FDA la richiesta di una nuova sperimentazione per la PEG-PAL (Poly Ethylene Glycol-Phenylalanine Ammonia Liase), precedentemente noto come Phenylase, da attuarsi nel corso del 2008.
- La I fase di studio valuterà la sicurezza e la farmacocinetica di iniezioni di dosi crescenti di PEG-PAL in circa 35 pazienti affetti da PKU.
- Ai pazienti della I fase sarà offerto di proseguire con la II fase (8 settimane), volta a determinare la sicurezza e l'efficacia di iniezioni settimanali.