Thérapeutiques des Maladies de Surcharge Lysosomale (MSL) évolutions actuelles

I.MAIRE

CETL, Paris 16 novembre 2007

Maladies Héréditaires du Métabolisme et Dépistage Néonatal
Centre de Biologie et de Pathologie Est, LYON-BRON

Hôpitaux de Lyon

Différentes Approches Thérapeutiques

- *Contourner le blocage (cystinose)*
- Thérapies cellulaires: Transplantations /Cellules souches
- Remplacer la protéine (absente ou défectueuse)
- Réduction de la synthèse du substrat
- Molécules chaperons
- Translecture du codon stop anormal
- Traiter les effets secondaires délétères (connaissance physiopathologie)
- Remplacer le gène de la protéine défectueuse

Thérapies cellulaires

Transplantations

- Rationnel : Source d'enzyme +/- clairance substrat

  Mécanismes plus complexes ?immuno - suppresseurs, corticoides, ….

- Foie et Rein

  Les greffes de foie ou de rein ne jouent pas le rôle de source d'enzyme
  Leur indication est le traitement d'une atteinte hépatique (Gaucher) ou d' une insuffisance rénale (Fabry) sévères

Greffe de cellules hématopiétiques

Rationnel – les cellules circulantes (monocytes surtout) migrent et colonisent les macrophages de la rate, de la moelle osseuse, les ostéoclastes, les cellules de Kupffer, les macrophages alvéolaires, cellules microgliales….

Evaluation difficile

- hétérogénéité clinique des malades
- chimérisme +/- important
- expérience limitée dans beaucoup de MSL

Limites des greffes de cellules hématopiétiques

- Diagnostic précoce indispensable (avant lésions irréversibles)
- Disponibilité d'un donneur compatible
- Mortalité et morbidité élevées
- Système nerveux central, os: résultats variables
- Ne guérit pas, modifie l'histoire naturelle

Evolution des thérapies cellulaires

- **Sang du cordon de donneur non apparenté**
  - moins de GvH, disponibilité rapide
  - l' intérêt de lui associer la TES reste à démontrer en dehors faibles chimérismes
- **Cellules souches hématopoiétiques**
  - peuvent être génétiquement modifiées pour surexprimer le gène d'intérêt pour plus d'efficacité thérapeutique (souris ASA-/-)
- **Cellules mésenchymateuses**
  - peuvent se différencier en ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes et astrocytes
  - perfusées en complément des cellules CD 34^{+} dans Hürler, Leucodystrophie Métachromatique : pas d'intérêt démontré
- **Cellules souches en injection intracérébrale**
  - Cellules souches : progéniteurs des cellules oligodendriales , progéniteurs des cellules neuronales et neurosphères génétiquement modifiées pour exprimer le gène d'intérêt, cellules souches embryonnaires et cellules mésenchymateuses
  - Développements en cours dans la Leucodystrophie Métachromatique, les maladies de Niemann-Pick A et C et d'autres pathologies neurodégénératives non lysosomales

TES Thérapeutiques Enzymatiques de Substitution

ERT Enzyme Replacement Therapy

Mécanismes d'adressage au lysosome

- **Endocytose dépendant de la clathrine**
  - Récepteur du M6P, du Mannose (cellules réticuloendothéliales: macrophages, placenta), du galactose (= des asialoglycoprotéines) (foie, cerveau, rein, thyroïde,….)
  - Récepteur de la transferrine TFR : passage possible de la barrière hématoencéphalique; agent d'adressage pour des médicaments dirigés au cerveau?
  - Récepteurs des LDL (LRP2 ou mégaline utilisée par cathepsine B dans tubule rénal), récepteur sortiline (pour adressage sphingomyélinase en complément adressage par M6PR)
  - médiée par des molécules d'adhésion cellulaire (CAM : cell adhesion molecules) trouvées dans des cellules endothéliales, neuronales (vecteur séquences peptidiques, ICAM-1 anticorps,…)

  Evolution : du fait d'une possible régulation négative ou d'un faible recyclage des récepteurs à la surface cellulaire chez les malades → utilisation de récepteurs artificiels construits pour s'associer aux régions riches en clathrine de la surface cellulaire (ex : fixation sur une enzyme recombinante d'un récepteur M6P)

- ***Endocytose en phase fluide*** *: plus lente (interactions de charge ou d'hydrophobicité avec la membrane, vecteurs polylysine,…). Pas d'application aux MSL*

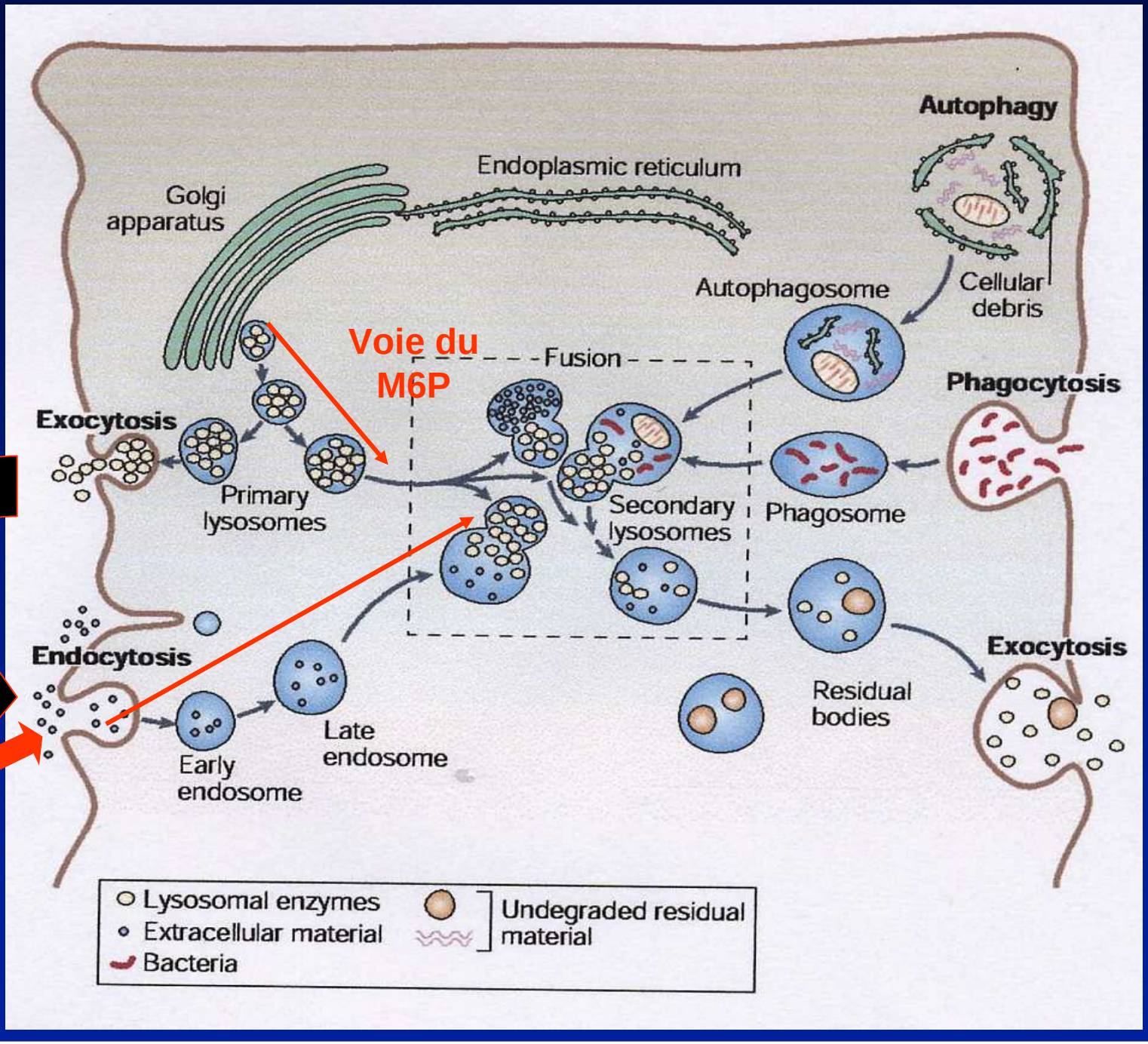
– *Bareford LM, Swaan PW, Advanced Drug Delivery Reviews 2007; 59: 748-58.*

Endocytose médiée par les récepteurs du mannose-6-phosphate

Voie du M6P

Enzyme

Médicament



Autres voies d'endocytose : ex de la maladie de Niemann Pick par déficit en sphingomyélinase(ASM)

- Utilisation de nanoparticules recouvertes de sphingomyélinase humaine recombinante et d'anticorps anti ICAM1(permettant l'endocytose par la molécule d'adhésion cellulaire ICAM1)
- Intérêts
  - Glycosylation non obligatoire (coûts de production moindres)
  - ICAM1 exprimée dans cellules endothéliales y compris celles de barrière hématoencéphalique
  - ICAM1 surexprimée dans l'inflammation
  - l'expression des récepteurs M6P est souvent réduite à la surface des cellules de malades atteints de MSL

→ 25% de l' enzyme sont dirigés dans les cellules endothéliales pulmonaires grâce à ces nanoparticules contre 2% avec un ciblage par les récepteurs M6P

Schuchman EH J Inherit Metab Dis 2007; 30: 654-63

Limites de la TES

- Coûts de production : recherche de nouveaux moyens de production
- Absence d'accès significatif à certains tissus
  - Système Nerveux Central
    - Néanmoins une faible clairance du substrat serait observée à forte dose pour certaines enzymes chez la souris : fortes doses de rhASA chez souris LDM rendues immunotolérantes (Matzner et al.2007) ou d' alpha mannosidase chez souris atteintes de mannosidose (Saftig et al.2007),..
    - Passage possible de la barrière hématoencéphalique par transcytose : récepteur de la transferrine, signaux peptidiques, Ac monoclonaux,… (groupe d'étude : Brains for Brain)
  - Os : découverte dun système d'adressage peptidique (Tomatsu et al. MPSIVA)
  - Cellules endothéliales : la capture de l'alpha galactosidase A recombinante par les cellules en culture endothéliales n'est pas inhibée par le M6P, mais cette capture passe néanmoins par un récepteur (T. Cox et al.2007)
  - Fibres musculaires de type II (maladie de Pompe)
- Réponse immune

Maladie de Pompe : résistance des fibres de type II à la TES

Il existe de mauvais répondeurs

Cette mauvaise réponse musculaire s'expliquerait par

Autophagie +++ dans fibres type II

en déficit énergétique

→ débris et glycogène présents hors des lysosomes

→blocage endocytose

Puis, atteinte microtubules…..

Marquage LAMP1 des fibres de types I et II de souris N (WT) et Pompe (KO) avant et après 2 mois (fibre de type I) ou 6 mois (fibre de type II) de TES)

Fukuda T. et al. Ann Neurol 2006; 59:700-8

Essai perfusion de hyaluronidase 10 min avant perfusion rhGAA pour améliorer l'efficacité de la TES : 1ers essais chez souris encourageants (*Matalon et al. BBRC 2006; 350:783-7*), **essais** ultérieurs **décevants**

TES et réponse immunitaire

- **Réponse humorale** : présence d'IgG fréquente, IgE exceptionnelle

Anticorps (Ac) parfois préexistants

Souvent : élévation maximale après ~12 semaines, puis diminution: "tolérisation"

- **Pas d'effet ou effet minimal des Ac sur la pharmacocinétique jusqu'ici dans les essais cliniques**
- **Anticorps neutralisants rares**
  - <0,5% Gaucher (1 patient : *Brady et al. Pediatrics. 1997, 100, E11*)
  - mais chez 2 des 3 premiers patients Pompe traités, perte de l'effet thérapeutique favorable au niveau musculaire (coeur OK)

TES et Anticorps (Ac) non ihibiteurs

Ac non inhibiteurs ne signifie pas absence d'effet sur la capacité de clairance du substrat

ex de la Leucodystrophie Métachromatique (*Matzner/Gieselmann- ESGLD Perugia 2007*)

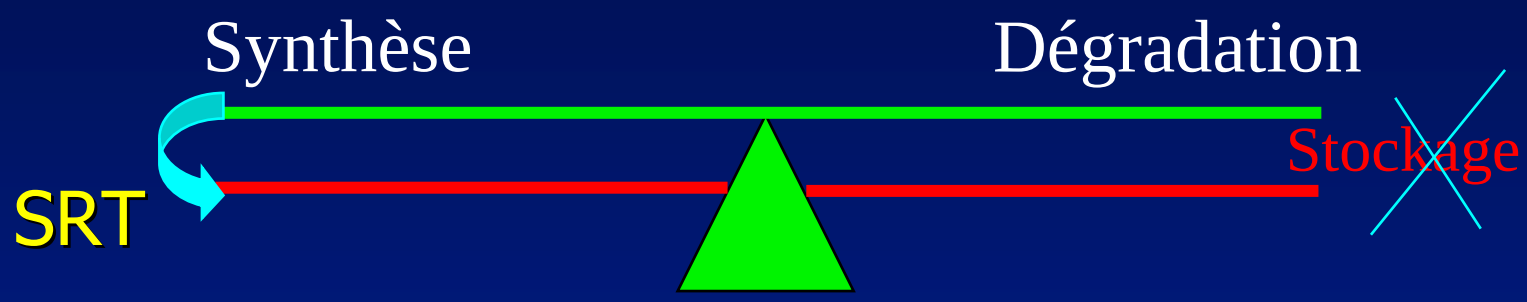
Dans les cellules de rein de souris *ASA*-/- en culture, la rhASA est redirigée vers les macrophages et non les cellules épithéliales (phagocytose massive); en outre, dans les cellules épithéliales elles-mêmes le peu de rhASA qui pénètre n'utilise pas le ciblage par les récepteurs M6P (et ne va pas dans vésicules LAMP1: lysosomes) mais est redirigé vers un autre récepteur (probablement le système récepteur Fe des macrophages)

Ex du Pompe : amélioration de l'efficacité par addition de traitement immunosuppresseur (*proposition d'ajouter du Méthotrexate chez les mauvais répondeurs*)

TRS Thérapie par réduction de la synthèse de substrat

SRT Substrate Reduction Therapy

TRS Thérapie par réduction de la synthèse de substrat



La réduction de la synthèse de substrat vise à rééquilibrer la vitesse de synthèse avec la vitesse de dégradation très réduite (une telle approche ne peut être efficace que s'il existe une activité de dégradation résiduelle)

- *Une seule application avec AMM : maladie de Gaucher (Miglustat/Zavesca)*
- *basée sur inhibition de la synthèse des glycosphingolipides*

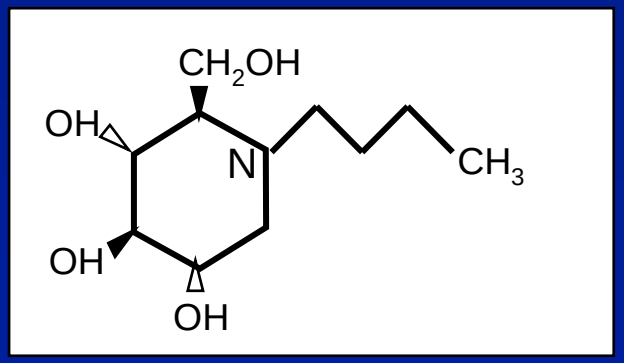
Miglustat / Zavesca ®

- Imminosucre N- butyldésoxynojirimycine (NB-DNJ) (analogue du glucose) qui inhibe la glucosylcéramide-synthase

Ceramide + UDP-Glucose ⇸ Glucosylceramide

Cible primaire : traitement du Gaucher

- Mais inhibe aussi d'autres enzymes : α–glucosidases I et II
  - Expliquant certains effets secondaires (diarrhées)



- Avantages pratiques
  - Soluble dans l'eau, traitement oral
  - Traverse un peu la barrière hématoencéphalique

TRS et maladies neurologiques

- A la différence des enzymes recombinantes, les inhibiteurs de biosynthèse passent un peu la BHE
  - Le miglustat a été ainsi testé sur plusieurs modèles animaux de neurolipidoses avec des allongements de la durée de vie dans certains de ces modèles murins
  - Toutefois, les formes neurologiques ont souvent une activité nulle de l'enzyme (pas d'effet dans Tay-Sachs infantile même administré en intrathécal : congrès Trieste, Mai2004).

- De plus certains imininosucres auraient un effet anti-inflammatoire et/ou un effet de molécules chaperons

Autres cibles primaires du Miglustat

- Gaucher neurologique (NIH)
- Gangliosidose à GM2 tardives (New York) essai serait décevant, malgré l' effet positif (augmentation de la durée de vie) qui avait été observé chez la souris Sandhoff
- Gangliosidoses à GM1 tardives

  Il faut une activité résiduelle

  Essais en cours
- *Fabry*

Cibles secondaires du Miglustat?

- Rôle de l'accumulation secondaire de gangliosides GM3 et GM2 dans le cerveau de beaucoup de MSL?
  - MPS I, II, III, NPA, NPC, α-mannosidose...
- En effet, dans les modèles animaux, une amélioration de la pathologie cérébrale (greffe de moelle, thérapie génique) entraîne une normalisation du profil des gangliosides, normalisation qui constitue un excellent marqueur de l'efficacité du traitement
- D'où l'idée d'essayer la réduction de synthèse des GSL dans Niemann-Pick C et MPS III

TRS en dehors des sphingolipides

- Gynestéine
  - La synthèse des glycosaminoglycanes (GAG) nécessite des facteurs de croissance EGF(Epidermal Growth Factor) et FSH (Follicle Stimulating Hormone)
  - La gynestéine est un phytostérol qui inhibe une protéine kinase tyrosine – spécifique du récepteur de l'EGF et en conséquence, parmi d'autres effets, la synthèse des GAG en inhibant l'expression d'un ou plusieurs gènes impliqués dans cette synthèse
  - Essais précliniques chez souris ko MPS II et cliniques dans MPS III en Pologne
- La transfection de lentivirus exprimant EGFP et de petits ARN interférants inhibant la glycogène synthase ou la glycogénine du muscle dans des myoblastes de maladie de Pompe limite beaucoup la synthèse et la surcharge en glycogène. Dans le muscle de souris atteintes de maladie de Pompe, l'injection de AAV/siRNA dans le muscle de souris Pompe pourrait permettre d'améliorer l'efficacité de la TES dans les fibres type II résistantes à thérapie en limitant la synthèse de glycogène (étude en cours : Douillard-Guilloux/Caillaud)

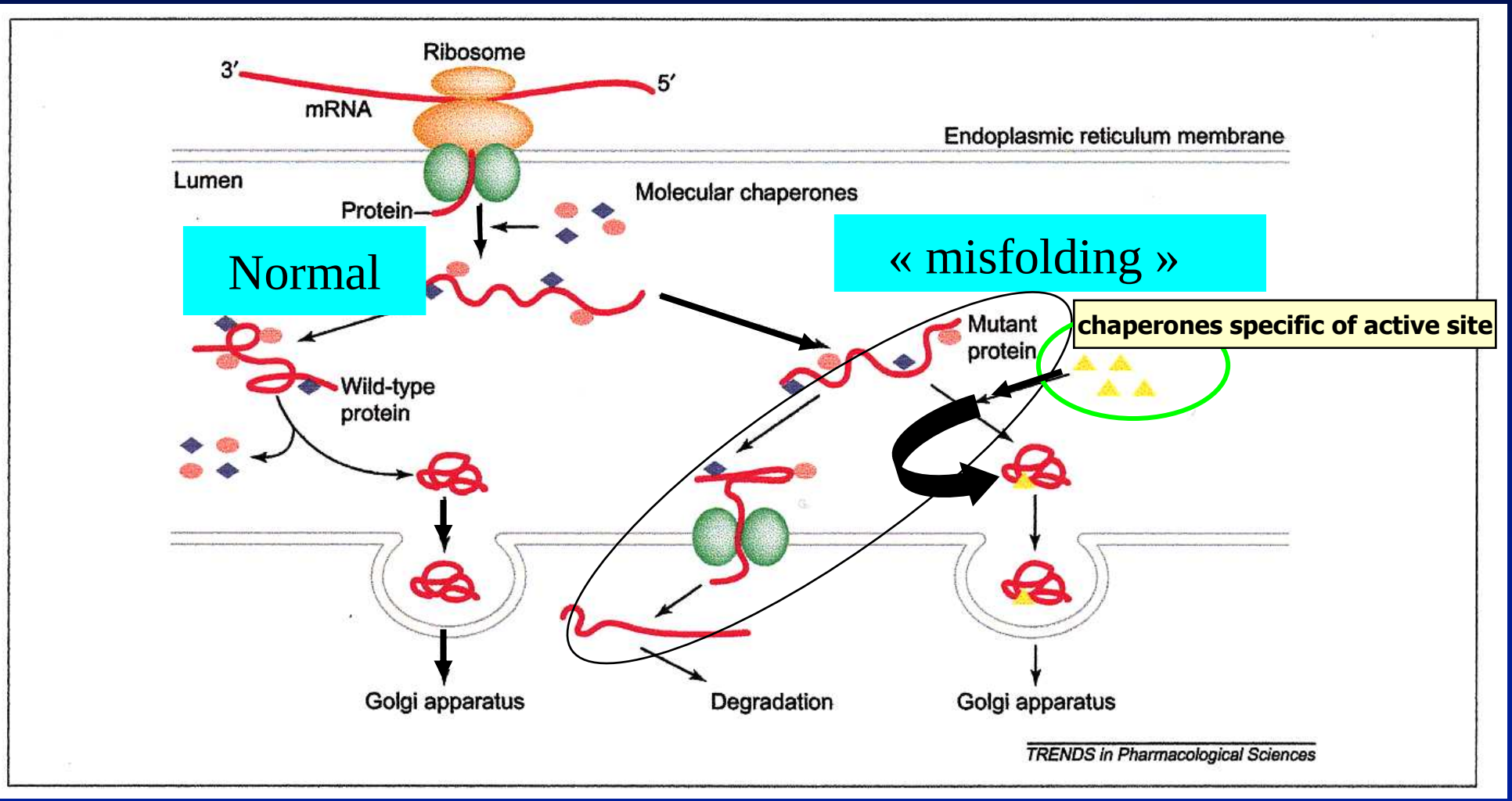
EET Enzyme Enhancement Therapy

Molécules Chaperons

chaperons pharmacologiques

- Approche visant à traiter les MSL (et les autres maladies génétiques) qui résultent d'une mauvaise conformation et/ou d'un mauvais adressage de protéines aux lysosomes
- Ces enzymes mal conformées pourraient avoir une certaine activité fonctionnelle si elles n'étaient pas détruites par les systèmes de contrôle de qualité de la cellule (mutations faux-sens, petites délétions sans décalage du cadre de lecture,…)
- Des chaperons pharmacologiques de faible poids moléculaire peuvent ainsi « sauver » des protéines

« chaperons » pharmacologiques



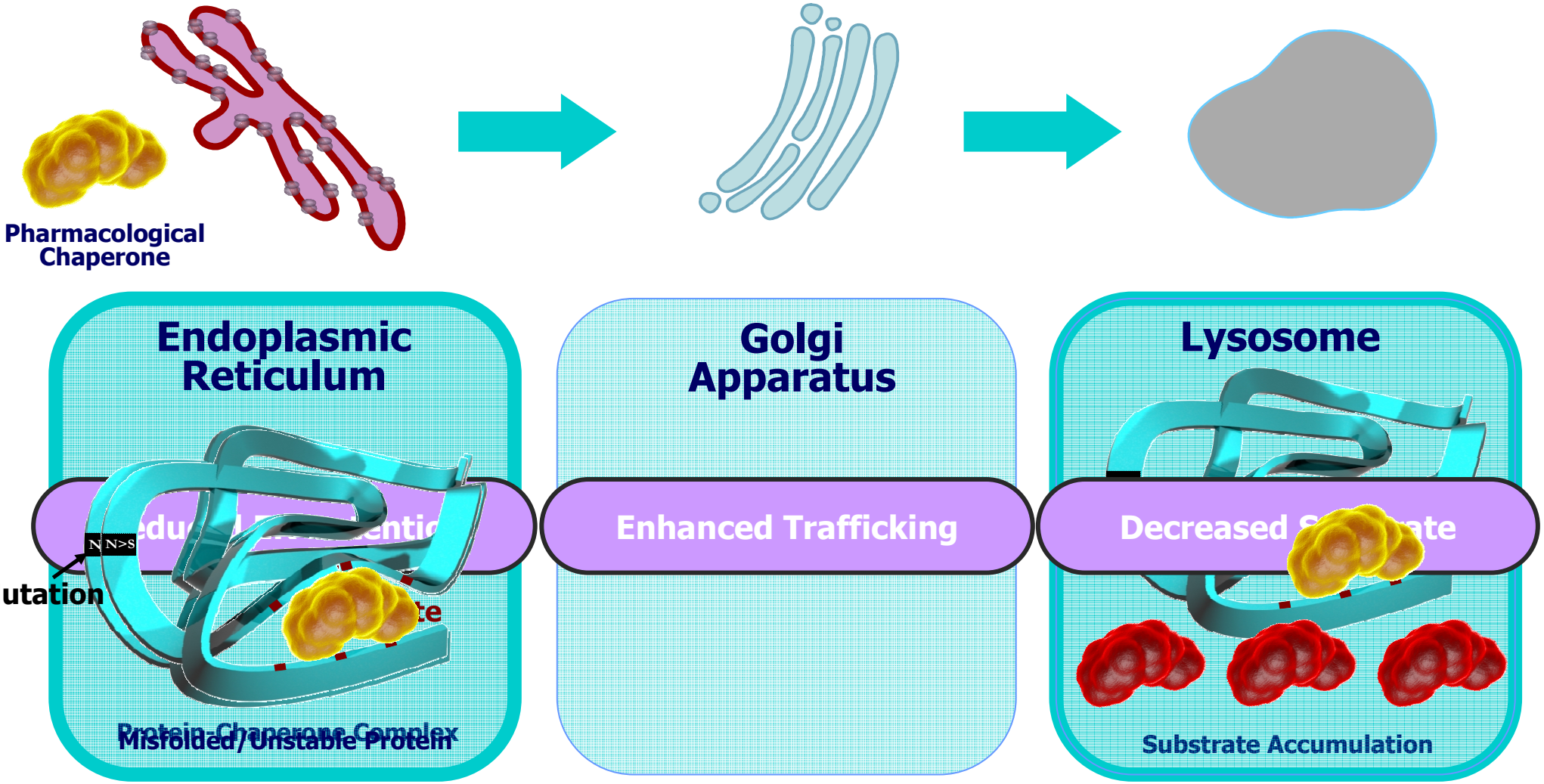
chaperons pharmacologiques

- **Ligands de faible poids moléculaires qui se lient à un site spécifique de la protéine mutante et l'accompagnent au cours de sa synthèse**
  - analogues du (des) substrat(s)
  - Inhibiteurs du site actif
  - cofacteurs
- Les mêmes molécules peuvent agir comme chaperons de l'enzyme dégradative à faibles concentrations et inhibiteurs de synthèse du substrat à plus haute concentration
- Limitation: approche pas générale mais mutation dépendante

Pharmacological Chaperones

Proposed Mechanism of Action

La prise doit être discontinue, la dose et l'espace entre 2 prises sont critiques



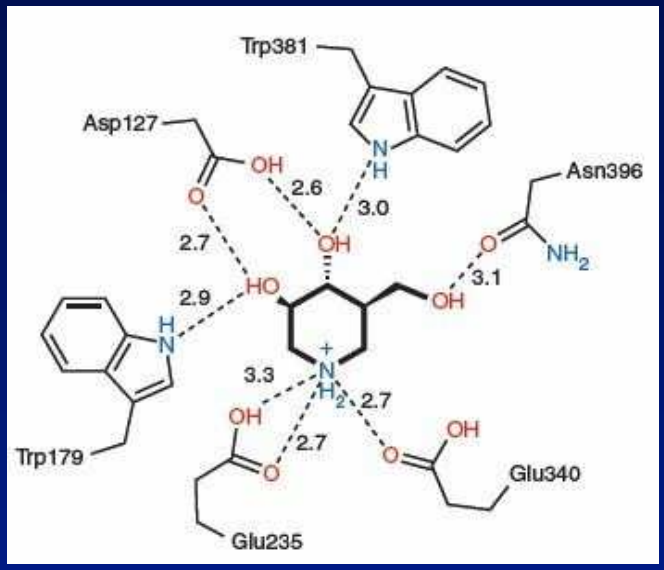
Avec la permission d'Amicus Therapeutics

Gaucher : isofogamine AT 2101 (Amicus therapeutics)

- Essais sur cellules en culture

  → Les mutations qui répondent

  N370S,L444P, D409H, V394L, G202R, F216Y
- Essais sur souris N → ↑activité glucocérébrosidase
- Essais sur souris L444P → ↑ activité glucocérébrosidase
- Essais cliniques
  - essai phase I terminé
  - essai phase II en cours

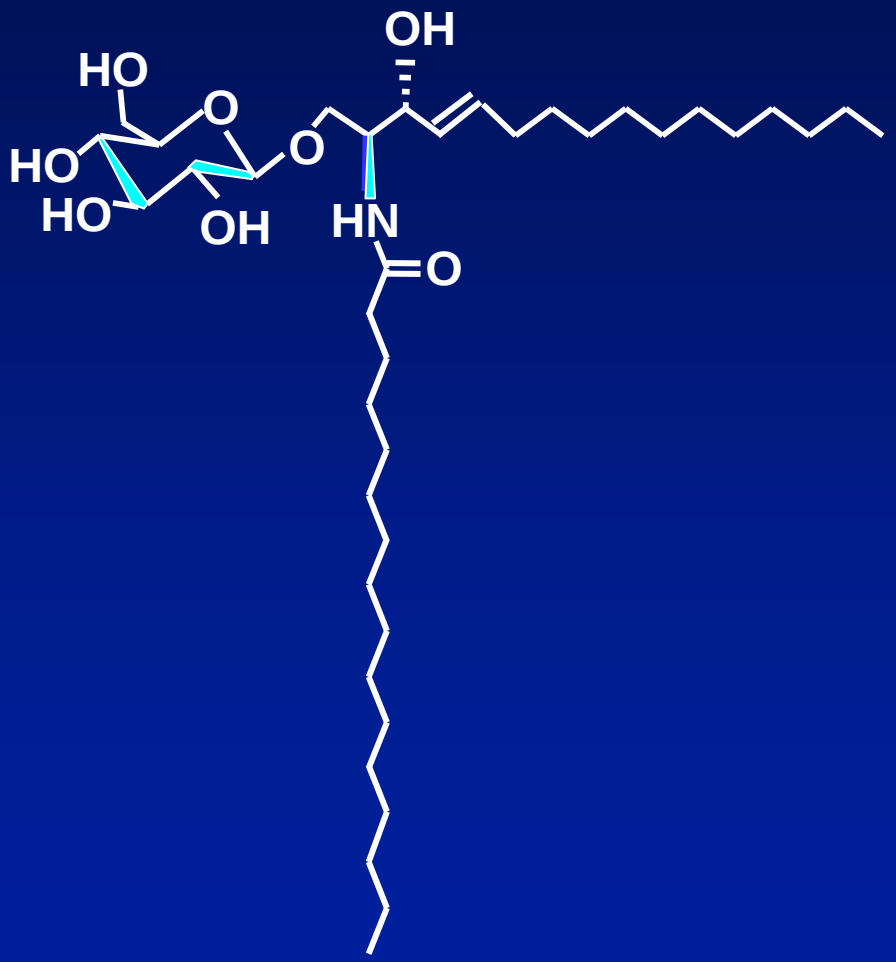


Chang et al. FEBS Journal 2007, 273: 4082-92

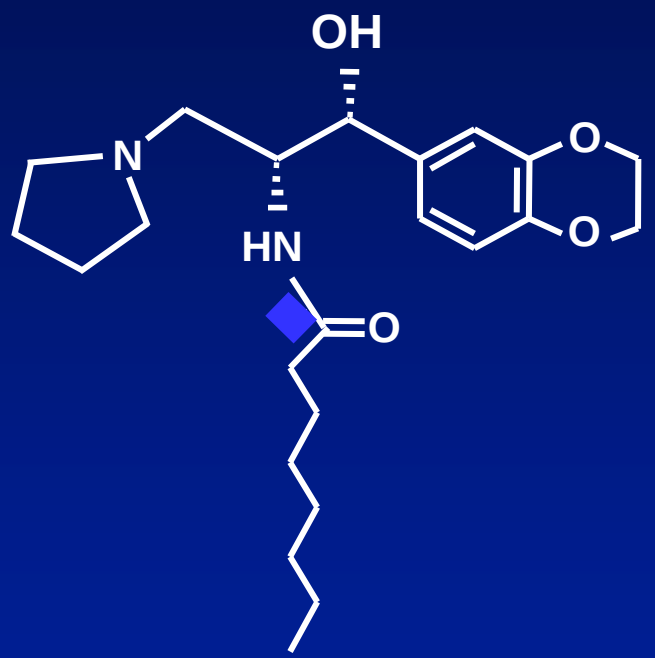
GAU-CL-201 Février à Août 2007: 32 type 1 de 18 à 65 ans recevant enzymothérapie ; 10 centres USA essai ouvert, randomisé 4 doses,
objectif I^{aire} : sécurité; objectif II^{aire} : GCase, GlcCer, chitotriosidase, PARC

GAU-CL-202 début Août 2007 recrutement en cours de patients type 1 de 18 à 65 ans naïfs; 24 semaines, 2 doses (USA 8 sites prévus, UK 2, Israel 2 + Allemagne M.Beck)
objectif I^{aire} : sécurité, tolérance ; objectif II^{aire}: pharmacocinétique

Gaucher : Genz-112638 (Genzyme)



Glucosylcéramide



Genz-112638 : **un nouvel analogue du glucosylcéramide**

Avec la permission de Genzyme

Gaucher : Genz-112638 (Genzyme)

Etudes précliniques *(K. A. McEachern, et al. Mol.Genet.Metab. 2007; 91(3):259-267)*

- Genz-112638 est un inhibiteur puissant conduisant à une réduction de l'accumulation de glucosylcéramide et spécifique de la glucosylcéramide synthase (en particulier il n'inhibe pas la glucocérébrosidase lysosomale, les α- glucosidases I ou II, l'amylo-1,6 glucosidase et les glycosidases intestinales : lactase, maltase et sucrase)
- Genz-112638 est bien toléré (pas de perte de poids,…) et efficace dans le modèle murin de maladie de Gaucher (D409V/nul) conduisant à une importante réduction du glucosylcéramide dans le foie, la rate et les poumons.

Essais cliniques

- Phase II (Israel, Amérique du Nord et du Sud,Russie) début essai ouvert débuté en 2006, 25 malades, 52 semaines, 2 doses avec pour objectifs cliniques principaux : concentration Hb, volume rate, *taux plaquettes*. Résultats finaux disponibles 2ème semestre 2008 ; résultats préliminaires positifs après 1 an chez 5 malades (Press Release Genzyme 17/05/2007).
- Des essais cliniques supplémentaires sont prévus.

Avec la permission de Genzyme

Fabry : AT 1001 (deoxygalactonojirimycine DGJ/Amigal / Amicus therapeutics)

- La validité du concept
  - Des infusions de galactose (1g/kg x 3/sem) améliorent un patient italien avec variant cardiaque qui a pu être retiré de la liste d'attente pour greffe cardiaque.
  - Essais DGJ sur fibroblastes de malades avec mutations R301Q ou Q279R (présentant un «variant cardiaque» avec activité résiduelle). Le DGJ active l'enzyme mutante à faible [c] et agit comme inhibiteur à haute [c]
  - Autres mutations : la majorité des mutations faux sens Fabry répondent au DGJ
- Essais précliniques chez la souris KO exprimant hR301Q transgène
  - DGJ/AT1001 : ⇑ activité GLA ⇓ concentration Gb3
  - Si prise moins fréquente de AT1001→ réduction plus importante du Gb3
    (demi-vie hR301QGALA: 2 à 2.5 jours et AT1001 2 à 3 heures)
- Essai cliniques
  - Phase I terminée sur volontaires sains : sécurité, tolérance OK et ⇑GLA
  - Phase II en cours

Pompe AT 2220 (1-désoxynojirimycine) (Amicus therapeutics)

- Essais précliniques
  - AT 2220 se lie et stabilise GAA (alors qu'Amigal, un autre iminosucre, est sans effet)
  - ⇑ GAA de certains mutants faux sens exprimés dans COS-7 et dans fibroblastes de malades GAA-P545L (Parenti et al. 2007: réponse également favorable des mutants L552P, G549R)
  - ⇑ GAA de souris et singes N (wild type) : justifiant l'essai de AT2220 dans mutation fréquente de l'adulte IVS1-13 (un peu de forme normale produite)
- Essais cliniques
  - Phase I 56 volontaires sains : 42 AT2220 et 14 placebo
    - POM-CL-101: 1 dose entre 50 et 600 mg
    - POM-CL-102 : 1 dose par jour pendant 7jours à doses croissantes de 50 à 450 mg
    - Effets indésirables modérés : maux de têtes, diarrhées, congestion des sinus…
  - Phase II va débuter

Autres chaperons: essais précliniques

- Gangliosidose à GM1*(Matsuda et al. PNAS, 2003)*
  - Le N-octyl-4- epi-β-valiamine ou NOEV est un dérivé du galactose, inhibiteur puissant de la β- galactosidase qui ,ajouté à très faible concentration au milieu de culture des fibroblastes déficitaires (portant la mutation R201C), restore l'activité β- galactosidase
  - Son administration orale à court terme au modèle murin de gangliosidose à GM1 juvénile (portant la mutation R201C) normalise GM1 et GA1 dans le cortex fronto- temporal et le tronc cérébral histochimiquement, mais pas biochimiquement
- Gangliosidose à GM2 tardive *(Tropak MB et Mahuran D, FEBS Journal 2007; 274:4951-61)*

  Le criblage à haut débit

  - d'une banque de 50 000 composés chimiques dont des dérivés ont été testés pour d'autres raisons et
  - de la librairie de 1040 composés approuvés par la FDA pour d'autres applications (intérêt en terme de coûts)

  a permis l' identification de 2 composés inhibiteurs compétitifs pouvant agir comme molécules chaperons : la NGT (N-acétylglucosamine thiazoline) et un médicament antimalaria la Pyrimethamine (dont 20% traversent la BHE)

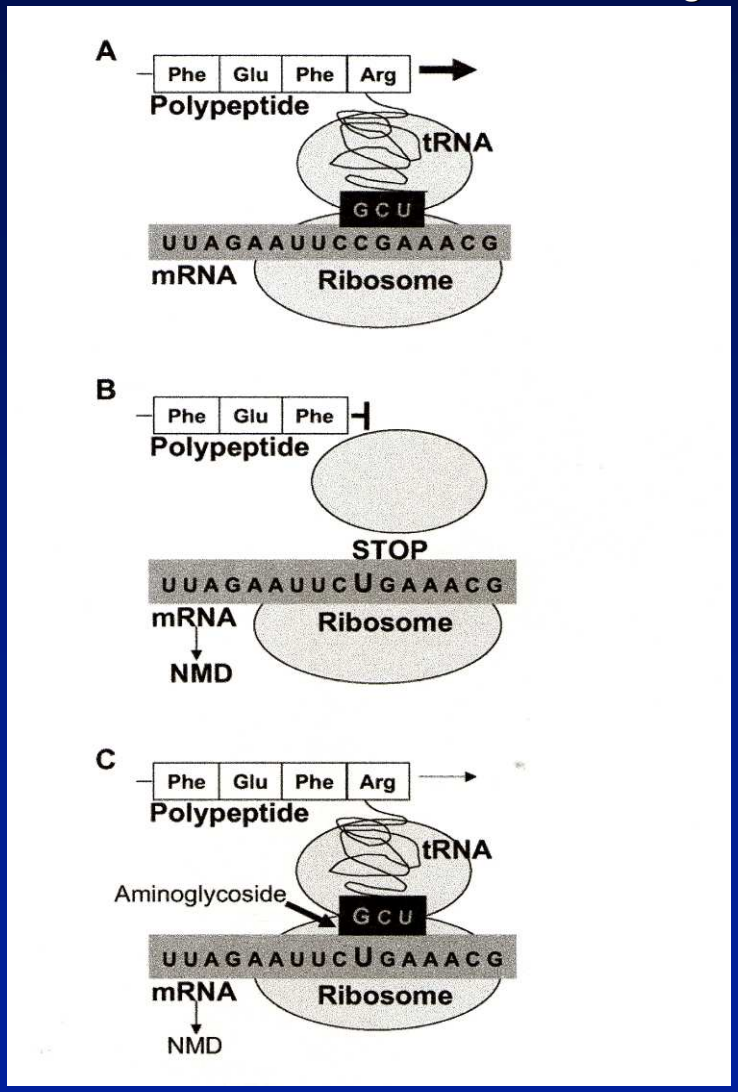
« Chaperons »

- Avantage potentiel: peuvent traverser la barrière hématoencéphalique
- Mais des limitations :
  - Principe applicable seulement à des mutations donnant naissance à des protéines de mauvaise conformation ou mal transportées
  - Alors que les formes neurologiques les plus sévères sont souvent dues à d'autres types de mutations (protéines tronquées, grandes délétions...etc...)

Translecture des codons stops
Premature termination codon mutations (PTC)

- Aminoglycosides
- PTC124
- Autre approche : exprimer des ARNt supprimant les stops

Aminoglycosides : gentamycine
Se lie au site ribosomal de décodage



Les Aminoglycosides

Possibilité de translecture dépend

-du codon stop possibilités de translecture UGA>UAG>UAA

-de son contexte(séquences en amont et en aval dont nucléotide juste en aval du stop C>U>A>G)

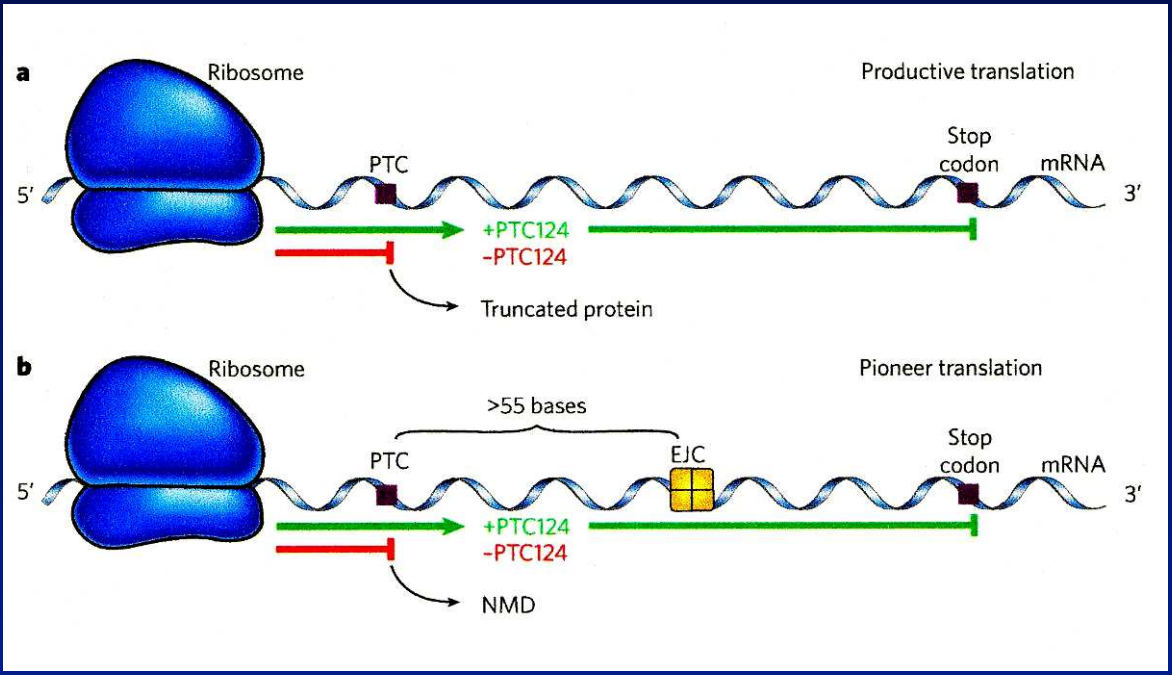
Rôle possible de gentamycine aussi sur NMDA (non sense mediated decay)

qui diminue la quantité de transcrit anormal si codon stop >55 nucléotides en amont de la jonction exon-intron

Limitations des aminoglycosides

- Manque de spéficité (translecture de stops corrects)
- Nephrotoxicité, ototoxicité

PTC 124 (PTC Therapeutics)



- permet d'obtenir une protéine fonctionnelle de longueur normale
- plus spécifique que les aminoglycosides (pas de translecture des codons stops normaux)

– Essais précliniques : effets favorables dans cystinose, CLN1, MPSI et dans Duchenne *(Welch EM et al. Nature 2007; 447: 87- 93);* pas d' effet favorable dans Mac Ardle

– Essais cliniques de phase 2

Mucoviscidose essais Israel/USA : 2 semaines/2 doses, France incluse dans phase 2b

Duchenne : 26 malades, 28 jours, 3 sites USA

– Essais dans d'autres pathologies ? : MPS I, III, …

Thérapies visant à traiter les phénomènes délétères secondaires

Les phénomènes secondaires induits par le déficit primitif sont souvent plus délétères que le déficit lui-même ou la surcharge

- ex: activation macrophagique (Gaucher)
  - Augmentations de cytokines, interleukines, cathepsines... qui jouent un rôle clé dans la pathologie
- ex: inflammation / apoptose (gangliosidose à GM2)
- Les déficits des enzymes lysosomales (ou de transporteurs de la membrane lysosomale) induisent parfois des déficits de production de certains composés : des supplémentations?
- Relations entre déficit et symptômes cliniques souvent pas évidentes : ces approches nécessitent une meilleure compréhension de la physiopathologie

Thérapie génique

Les maladies de surcharge lysosomale sont de bons candidats pour un traitement par transfert de gènes

- sécrétion - recapture des enzymes
- faible niveau d'activité suffisant pour correction
- régulation étroite du niveau de production probablement pas nécessaire
- Modèles animaux naturels ou transgéniques pour presque toutes les affections (souris, mais aussi gros animaux - chien,chat....)

Maladies avec atteinte du SNC

- Actuellement de nombreux exemples démontrant la faisabilité du transfert de gènes dans le SNC pour les MSL
- Injections intraventriculaires ou stéréotaxiques (striatum)+ injections systémiques (tolérisation)
- vecteurs: adenovirus, AAV, lentivirus, herpès
  - AAV et lentivirus: bonne sécurité, transduction de cellules apparemment quiescentes et expression prolongée
- Challenges : passer des souris au gros animal (plusieurs injections) et déterminer la période possible d'intervention (âge / développement de la maladie) pour efficacité

Perspectives

- TES : utilisation d'autres voies d'adressage pour de nouvelles cibles tissulaires et une meilleure efficacité , diminution des coûts de production,…
- TRS : nouveaux composés plus spécifiques et moins toxiques
- Nouvelles molécules chaperons
- Combiner des thérapies de principes différents
- + approches pour traiter les phénomènes secondaires
- Passage en clinique de la thérapie génique et cellulaire

Au total : vers une carte personnalisée avec des options thérapeutiques individuelles

Difficultés : qui traiter ? (pronostic), quand? (intérêt du présymptomatique?), comment?, à quelle dose?