

SO.S.T.E. *Notiziario*

Organo ufficiale della Società per lo studio delle Talassemie ed Emoglobinopatie - SO.S.T.E.

Volume 1, numero 6

Dicembre 2000

IL PRESIDENTE INFORMA...

Si avvicina la data (22-25 marzo) in cui si svolgerà l'11° ICOC a Catania ed è facile comprendere il notevole impegno organizzativo che ha comportato per la SOSTE in rapporto alle nostre forze.

Mi auguro, naturalmente, che la partecipazione dei soci sia la più ampia possibile e che i risultati scientifici dell'importante assise siano rispondenti alle aspettative di noi tutti che ci occupiamo di talassemia e dei pazienti, cui abbiamo dedicato una sessione per l'incontro e il confronto con i medici sulle novità della terapia chelante.

In questo numero di SOSTE Notiziario, l'ultimo dell'anno 2000, pubblichiamo la traduzione, a cura della dottoressa Rosalba Di Marzo, della relazione su "Terapie sperimentali per la cura dell'anemia falciforme e della β -talassemia", che il Prof. Yves Beuzard Direttore del Laboratorio sperimentale di terapia genica - Institute Universitaire d'Ematologie Inserm di Parigi - ha tenuto a Palermo nell'ottobre 1999 nell'ambito del seminario organizzato dalla nostra società in collaborazione con l'Associazione di ricerca "Piero Cutino" di Palermo.

Quindi riportiamo, a cura della dottoressa Santina Acuto, che ringraziamo vivamente, un breve aggiornamento dell'articolo pubblicato nel numero 3 del dicembre 1999 di

"SOSTE Notiziario" sullo stato attuale della terapia genica, alla luce della conferenza tenuta dal Prof. Sadelain a Roma il 22 ottobre 2000.

Una notizia senza dubbio positiva è l'entrata in attività dello SQUID installato a Torino che rende più a portata di tutti la determinazione esatta della concentrazione epatica del ferro con

una metodica non invasiva e quindi facilmente ripetibile. In considerazione dell'importanza che assume tale esame per un talassemico ai fini del monitoraggio del carico di ferro e di conseguenza della definizione della terapia chelante più adeguata, abbiamo chiesto al Dr. Piga, Responsabile del Centro di Microcitemia e dello SQUID di Torino, di illustrarci i vantaggi di questa metodica e l'organizzazione dopo questo primo periodo di attività.

Infine, ho il piacere di riportare una sintesi del trial clinico multicentrico randomizzato sulla terapia ferrochelante e l'associazione Desferal-Ferriprox, presentato dal dott. Maggio, che il Comitato Direttivo della SOSTE ha ampiamente discusso ed approvato.

Carmelo Magnano

IN QUESTO NUMERO

Il Presidente informa...

C. Magnano pag. 57

Terapie sperimentali per la cura dell'anemia falciforme e della β -talassemia

Y. Beuzard, L. De Franceschi pag. 58

Progressi nella ricerca per la terapia genetica della β -talassemia e dell'anemia falciforme

S. Acuto pag. 62

Lo SQUID di Torino

A. Piga pag. 63

Nuovo trial L1 - DF

A. Maggio pag. 64

11th INTERNATIONAL CONFERENCE ON ORAL CHELATION IN THE TREATMENT OF THALASSAEMIA AND OTHER DISEASES

22-25 MARCH, 2001

HOTEL SHERATON CATANIA

ASSEMBLEA DEI SOCI SO.S.T.E. DOMENICA 25 MARZO ORE 8.45

Con l'elezione di 4 consiglieri
e del collegio sindacale
per il nuovo comitato direttivo 2001/2002

Segreteria organizzativa

Studio EXEDRA

Tel. 095.374729

e mail: studio_exedra@rocketmail.com

terapie sperimentali per la cura dell'anemia falciforme e della β -talassemia

Yves Beuzard, Lucia De Franceschi

Laboratoire experimental de therapie genique
Institute Universitaire d'Ematologie-Inserm-Paris

Traduzione a cura della Dr. Rosalba Di Marzo
Centro Regionale di Riferimento per la Diagnosi e la Terapia
Fetale delle Emoglobinopatie - Unità di Ricerca "Piera Cutino"
Azienda Ospedaliera "V.Cervello" Palermo

L'anemia falciforme e la β -talassemia sono delle malattie genetiche per diversi aspetti ideali per la realizzazione di una terapia specifica a livello cellulare, proteico o genetico. In primo luogo, le cellule differenziate, i precursori e le cellule staminali possono essere facilmente prelevate per studi "ex vivo". Secondo, i meccanismi e la patofisiologia di queste malattie sono ben conosciuti: le mutazioni specifiche del gene della β -globina, la struttura anomala dell'emoglobina S, i difetti cellulari secondari e le interazioni dei globuli rossi anomali con altre componenti vascolari o del sangue. Terzo, esistono dei modelli animali di topo che sono determinanti per la valutazione "in vivo" di nuove terapie. Infine, negli ultimi dieci anni, una comunità cooperativa medico-scientifica si è notevolmente impegnata per la definizione di protocolli e di nuove terapie sperimentali.

Per quanto riguarda l'anemia falciforme, lo scopo principale degli approcci terapeutici è quello di diminuire la concentrazione intracellulare dell'emoglobina S che, polimerizzata, è responsabile della vaso-occlusione, delle crisi falcemiche e di molte complicanze che minacciano la vita e gli organi (Bunn, 1997). Per la β -talassemia major, lo scopo delle terapie è quello di fornire eritrociti normali per sostituire quelli anomali, oppure di migliorare la sopravvivenza e l'efficacia di produzione degli eritrociti rimpiazzando le catene β -globiniche mancanti, o di prevenire i difetti secondari. Le terapie cellulari (trasfusioni e trapianto di cellule staminali emopoietiche), hanno delle limitazioni rilevanti. Nuovi farmaci che attivano la produzione dell'emoglobina fetale migliorano le condizioni dei pazienti falcemici, ma non sono privi di rischi ed a tutt'oggi hanno degli effetti lievi sulla β -talassemia. Infine, la terapia genica è lontana dall'essere disponibile in un futuro immediato.

Di conseguenza, si stanno studiando altre terapie in grado di migliorare i difetti cellulari e vascolari delle emoglobinopatie (Vichinsky et al., 1998) e queste saranno oggetto della seguente relazione.

Molte delle nuove terapie sperimentali, poiché prevengono l'ossidazione, i difetti di membrana, l'emolisi, le interazioni cellulari, o promuovono la proteolisi delle catene emoglobiniche, o la chelazione del ferro, sono comuni sia all'anemia falciforme che alle sindromi talassemiche.

Modificatori dell'emoglobina.

Anemia falciforme.

In un primo tempo le terapie specifiche per l'anemia falciforme miravano soprattutto alla diminuzione della falcizzazione. A tale scopo sono state saggiate alcune sostanze come i nitriti, il monossido di carbonio e l'urea per cercare di diminuire la proporzione di deossiemoglobina S, la forma in cui avviene la polimerizzazione dell'emoglobina S, ma tutto questo non diminuì la frequenza o la severità delle crisi falcemiche.

Successivamente la scelta degli agenti antifalcizzanti è stata migliorata dalla precisa conoscenza dei livelli atomici della struttura terziaria dell'emoglobina; attraverso la cristallografia a raggi X sono stati rilevati i contatti intermolecolari; ed inoltre la microscopia ad alta risoluzione evidenziò nelle cellule a falce i polimeri intrecciati.

Si osservò che vari tipi di composti chimici erano in grado di inibire il contatto intermolecolare o incrementare l'affinità per l'ossigeno dell'emoglobina S: le mostarde azotate ed altri agenti alchilanti, i piridossani e le altre aldeidi che formano la base di Schiff, i reagenti sulfidrilici etc., ma la bassa specificità e la tossicità di molti di questi agenti antifalcizzanti ne precludeva l'uso nei trials clinici.

A tutt'oggi, cinquanta anni dopo la scoperta della proteina anomala, nessuno delle centinaia di agenti antifalcizzanti che inibiscono la polimerizzazione *in vitro* dell'emoglobina S viene utilizzato in clinica, infatti le molecole di emoglobina sono ad una concentrazione molto elevata all'interno degli eritrociti e inoltre i globuli rossi anomali mostrano un turnover così elevato da richiedere l'uso di una quantità troppo grande di potenziali farmaci. Inoltre, il farmaco non dovrebbe influenzare le funzioni fisiologiche dell'emoglobina, e dovrebbe essere specifico e non tossico alla dose efficace. I notevoli progressi attualmente raggiunti dalla ricerca sui farmaci e sulla struttura del polimero dell'emoglobina S dovrebbero essere utilizzati per la ricerca di modificatori dell'emoglobina con specifiche proprietà antifalcizzanti. Particolare interesse riveste il monossido di azoto e i composti che rilasciano NO.

β -talassemia

Nella terapia della β -talassemia major, la cui severità è in relazione all'eccesso delle catene globiniche a spaiate, potrebbero essere utilizzati dei modificatori che hanno come bersaglio le catene a globiniche. La riduzione

delle catene a libere e dell'ossidazione e rilascio dell'eme potrebbero trasformare il morbo di Cooley in una forma di talassemia intermedia.

Inibitori della disidratazione degli eritrociti

Nelle cellule falcemiche, la quantità e la velocità di formazione dei polimeri dipendono da parecchie variabili: la concentrazione intracellulare di HbS, la pO_2 , altre emoglobine come HbF o HbA₂, che potrebbero interferire nella polimerizzazione dell'HbS, la temperatura, il pH e la concentrazione del 2-3 difosfoglicerato (2-3 DPG) che stabilizza la deossiemoglobina S (forma che polimerizza). Tra questi, il fattore determinante per la formazione dei polimeri è la concentrazione intracellulare di HbS (Eaton e Hofrichter, 1987).

I danni alle membrane indotti dalla polimerizzazione determinano la disidratazione delle cellule originando un numero sostanzioso di eritrociti molto densi (Joiner, 1993). Contribuiscono anche alla disidratazione delle cellule falcemiche il co-trasporto potassio-cloruro (flusso K-Cl) e i canali del potassio attivati dal calcio, i cosiddetti canali Gardos (Lew et al., 1991). La formazione dei polimeri dell'HbS favorisce l'incremento della permeabilità della membrana ai cationi, inclusi Ca^{++} e Mg^{++} . L'incremento temporaneo del calcio è sufficiente a scatenare l'attività dei canali Gardos con conseguente perdita di acqua. Diminuire la concentrazione di HbS per rigonfiamento ipotonico fu l'approccio iniziale attraverso una terapia antidiuretica (desmopressina) e una dieta povera di sodio, ma questa disidratazione non selettiva si rivelò neurotossica. Si è dimostrato che un agente che aumenta la permeabilità al sodio (Cetiedil), aveva degli effetti benefici nel ridurre le crisi falcemiche (Benjamin et al., 1986), ma non sono stati compiuti ulteriori studi su questo agente. Si è visto, inoltre, che alcuni agenti bloccanti i canali del calcio (Verapamil, Diltiazem, Bepridil, etc.) inibivano la falcizzazione e la disidratazione degli eritrociti *in vitro*, ma avevano scarso effetto *in vivo*.

Clotrimazolo e canali al K^+ attivati dal Ca^{2+} (canali Gardos)

Progressi considerevoli sono stati compiuti di recente sullo sviluppo di terapie che inibiscono la perdita di potassio e acqua dagli eritrociti falcemiche e riducono la formazione di cellule falcemiche dense e disidratate. Il Clotrimazolo è il più potente inibitore dei canali Gardos. La sua efficacia è stata valutata *in vivo* su un modello animale di topo per l'anemia falciforme, il topo SAD (De Franceschi et al, 1994). È stato effettuato, inoltre, uno studio a breve termine su pazienti con anemia falciforme: il trattamento col farmaco induceva una diminuzione della disidratazione delle cellule rosse e un

incremento di K^+ (Brugnara et al., 1996); gli effetti collaterali si limitarono ad una moderata disuria. Gli studi attuali sono indirizzati al saggio del trattamento a lungo termine con CLT e alla combinazione della terapia con idrossiurea.

Trasporto di Magnesio e K-Cl

Il Magnesio cellulare ha un effetto diretto sul volume degli eritrociti e sul loro contenuto di acqua. Quando l' Mg^{++} cellulare è aumentato, il Cl^- entra nelle cellule per compensare la carica positiva degli ioni, mediante un flusso d'acqua osmotico e conseguente rigonfiamento delle cellule. Negli eritrociti falcemiche è stato visto un contenuto più basso di Mg, specialmente nella frazione densa contenente le cellule irreversibilmente falcemiche (ISC) Olukoga et al., 1990. Sono stati valutati gli effetti di una somministrazione orale di Mg nel modello SAD di topo falcemico, e si è visto che questa preveniva la disidratazione degli eritrociti e la perdita di potassio.

Studi di somministrazione orale del magnesio sono stati compiuti per 4 settimane e per 6 mesi anche su pazienti falcemiche. Si rilevò un incremento di Mg e K nelle cellule rosse, e analisi citometriche erano indicativi di una idratazione migliorata delle cellule.

La somministrazione di Mg diminuisce anche la disidratazione delle cellule rosse in casi di β -talassemia intermedia nell'uomo. Studi in corso stanno valutando gli effetti della somministrazione di Mg a lungo termine in pazienti con anemia falciforme in omozigosi.

Monossido di Azoto

Il monossido di azoto (NO) è un composto di grande interesse. Viene rilasciato localmente come prima difesa contro gli agenti infettanti, è altamente diffusibile in vari tessuti, ed ha proprietà vaso-dilatatorie. L'NO inibisce l'adesione dei leucociti all'endotelio, l'attivazione e l'aggregazione delle piastrine e inoltre interagisce con i globuli rossi.

Basse concentrazioni di monossido di azoto incrementano specificamente l'affinità per l'ossigeno degli eritrociti falcemiche (Head et al., 1997). È da notare che l'idrossiurea, che aumenta l'espressione dell'emoglobina fetale e la severità clinica dell'anemia falciforme (Charache et al., 1995) è anche un donatore di NO.

Il monossido di azoto può avere diversi effetti benefici:

- 1) a livello eritrocitario diminuendo la formazione dei polimeri,
- 2) diminuendo l'aderenza cellulare e l'aggregazione delle piastrine
- 3) come vaso modulatore nelle aree ipossiche

Sono necessari ulteriori studi per determinare l'utilità dell'inalazione di NO, di arginina e di donatori di NO

nel trattamento di crisi falcemiche e successive ischemie acute di vari organi.

Terapia antiaderenza

Nell'anemia falciforme e nella β -talassemia le interazioni cellulari tra gli eritrociti, le cellule endoteliali, i leucociti e le piastrine sono aumentate; per questo motivo, bersagli per nuove terapie potrebbero essere le interazioni anomale cellula-cellula.

Farmaci come il RheothRx, che inibiscono l'aggregazione degli eritrociti e l'aderenza degli eritrociti all'endotelio vascolare, sono stati usati in trials clinici per curare le crisi di dolore (Adams-Graves et al., 1997); in questi casi è stato ridotto significativamente l'uso degli analgesici, il dolore intenso e, inoltre, si mostrava una diminuzione degli episodi dolorosi e dei giorni di ospedalizzazione.

Un approccio terapeutico interessante potrebbe essere l'inibizione dei recettori o del rilascio dei fattori che incrementano l'aderenza degli eritrociti mediante ponti intercellulari. E' stato dimostrato che la terapia con idrossiurea inibisce l'aderenza delle cellule falcemiche e riduce l'espressione delle CD36 e delle molecole a4b1 sulle cellule rosse, che sono recettori per molecole di adesione presenti anche nelle cellule endoteliali. Decrescendo il numero dei leucociti e degli eritrociti con marker di membrana fagocitari, l'idrossiurea molto probabilmente giuoca un ruolo importante nel miglioramento delle patologie vascolari dell'anemia falciforme.

Terapia con anticoagulanti e antiplastrinici

Nell'anemia falciforme lo scopo principale di potenziali terapie anticoagulanti è la prevenzione delle ischemie e delle complicazioni neurovascolari, così come le sindromi acute di angina, e altre complicazioni possono essere migliorate dalla prevenzione di trombosi, e di trombi sanguigni all'interno di piccoli e grandi vasi.

E' stato dimostrato che piccole dosi di eparina prevenivano molti episodi dolorosi o riducevano i giorni di ospedalizzazione; basse dosi di cumadin riducevano la formazione di trombina senza produrre effetti collaterali. Per l'anemia falciforme è in corso un trial prospettico di eparina a basso peso molecolare. Altri nuovi anticoagulanti sono in fase di studio.

Proteolisi

β -talassemia

Il contenuto cellulare di catene α globiniche spaite, conseguenza di una deficienza nell'espressione di catene β globiniche, è un fattore critico per l'anemia e per la patofisiologia delle sindromi β -talassemiche. La quanti-

tà di catene α libere è il risultato dello sbilanciamento tra un eccesso relativo delle catene globiniche α , e la velocità di proteolisi delle catene solubili α e delle catene precipitate e aggregate presenti nei corpi di Heinz o associate alla membrana.

Per questo motivo, la proteolisi delle catene α globiniche è stata ampiamente studiata nei reticolociti presenti nel sangue o negli eritrociti lisati ottenuti dai pazienti β -talassemici. Uno tra i maggiori sistemi per la proteolisi delle catene α solubili nei reticolociti, è rappresentato dal proteosoma 26 S ubiquitina-ATP dipendente (Shaeffer e Kania, 1995). Le catene α vengono idrolizzate quando sono legate all'ubiquitina; così la capacità proteolitica degli emolisati derivati da sangue di pazienti β -talassemici può essere incrementata aggiungendo un inibitore dell'enzima che idrolizza il legame tra l'ubiquitina e le catene α globiniche. Questi risultati potrebbero essere la base per un approccio terapeutico volto ad incrementare la proteolisi delle catene α .

Anemia falciforme

Nel caso di determinanti talassemici associati alle mutazioni β^S (β^S/β^S talassemia o $\beta^S/\beta^S + \alpha$ -talassemia), la proteolisi aumentata delle catene globiniche spaite (α o β^S) dovrebbe ridurre la severità clinica della malattia. Comunque ancora non ci si è indirizzati verso questo importante obiettivo terapeutico.

Antiossidanti

Chelanti intracellulari del ferro

La β -talassemia e l'anemia falciforme sono caratterizzate da reazioni ossidative anomale degli eritrociti catalizzate dal ferro "libero" associato alle membrane, dai derivati dell'eme e dai precipitati dell'emoglobina o delle catene emoglobiniche (Repka e Hebbel, 1991; Shalev e Hebbel 1996a, 1996b; Browne et al., 1998).

I depositi di ferro libero nelle cellule eritroidi contribuiscono alla patofisiologia della β -talassemia quindi un chelante del ferro che rimuove i depositi di ferro libero dalle membrane può migliorare lo stato fisiologico degli eritrociti.

Un chelante del ferro ideale dovrebbe essere esadentato per legare il ferro (come la deferoxamina), ma dovrebbe essere in grado di rimuovere il ferro intracellulare ed anche quello associato alle membrane (come il deferiprone).

Chelanti dell'eme

I derivati dell'eme rilasciati dall'emoglobina anomala e denaturata e le catene emoglobiniche hanno attività ossidante. Gli agenti che inibiscono questa attività potrebbero diminuire i difetti eritrocitari.

Antiossidanti

I pazienti β -talassemici sono soggetti a danni tissutali perossidativi ad opera dei derivati del ferro e dell'eme rilasciati nelle e dalle cellule eritroidi e dal sovraccarico di ferro secondario. I prodotti della perossidazione sono aumentati nel siero di circa due volte rispetto ai soggetti normali. Numerosi antiossidanti come la L-glutammina, l'allopurinolo, l'acido ascorbico hanno mostrato di essere in grado di diminuire i danni da perossidazione degli eritrociti falcemici (Sertac et al.,1997). I flavonoidi vegetali e i polifenoli sono antiossidanti di potenziale interesse, specialmente i polifenoli del the; in pazienti con β -talassemia intermedia è in corso un trial terapeutico con il the che può diminuire anche l'assorbimento del ferro. Inoltre, sono stati individuati nuovi antiossidanti che proteggono gli eritrociti da eventi emolitici e stress ossidativi, come il nitrossido indolinico e chinolinico (Gabbianelli et al. 1997), il dimetilsugenolo e l'N-allylsecoboldino (Teng et al.,1996).

Sostituti del sangue

Come fonti alternative di sangue per la trasfusione, sono in via di sviluppo vari sostituti del sangue. Sono state preparate soluzioni di emoglobina da sangue umano, emoglobina bovina (Gonzales et al.,1997) o da emoglobina ricombinante (Ming Swi Chang,1997). Ma le infusioni dell'emoglobina, a parte la sorgente, presentano parecchi problemi da superare come l'induzione della vasocostrizione, la rapida ossidazione, la perdita dell'attività nel plasma e la breve vita media (Ming Swi Chang,1997; Doherty et al.,1998).

Una nuova fonte di emoglobina può teoricamente essere rappresentata dalle colture delle cellule staminali provenienti dal sangue del cordone ombelicale. In un prossimo futuro, colture a lungo termine di cellule staminali con pieno differenziamento verso la linea eritroide, potrebbero portare alla sintesi di emoglobina fino a 30 mg per cellula staminale (Glaser,1998; Malik et al.,1998).

Conclusioni

Nei primi trials clinici di terapie specifiche per l'anemia falciforme, il maggiore criterio di efficacia era il miglioramento del dolore; ma nella maggior parte dei casi i risultati sono stati deludenti.

Al giorno d'oggi sono stati compiuti parecchi passi avanti nella conoscenza della patofisiologia della malattia e della complessa interazione intravascolare delle cellule (eritrociti falcemici, reticolociti, cellule endoteliali, vari tipi di leucociti), delle proteine e dei fattori di

regolazione, permettendoci di valutare le terapie sperimentali in maniera più specifica e a diversi livelli di complessità.

A tale fine è importante anche il ruolo dei modelli animali, che ci permettono di confermare le ipotesi *in vivo*, prima dell'esecuzione dei trials clinici.

Infine, insieme con gli approcci molecolari da compiere a livello di proteina o di gene, e il rimpiazzamento cellulare attraverso il trapianto, un insieme di terapie in grado di compensare le conseguenze deleterie della malattia primaria, potrebbero migliorare la sopravvivenza e la funzione degli eritrociti malati, e quindi la qualità di vita, e molto probabilmente l'aspettativa di vita di molti pazienti con gravi emoglobinopatie.”

Bibliografia

1. Adams-Graves P et al. (1997)-Blood 90,5:2041-2046
2. Benjamin LJ et al. (1986)-Blood 67:1442-47
3. Browne P et al. (1998)-Free Radic.Biol.Med. 24(6):1040
4. Brugnara C et al. (1996)-J.Clin.Invest. 97:1227-34
5. Bunn HF (1997)-N.Engl.J.Med. 337:762
6. Charace S et al. 332(20):1317-1322
7. De Franceschi L. et al.(1994)-J.Clin.Invest. 93:1670
8. Doherty DH et al.(1998)-Nature Biotech. 16-672
9. Eaton and Hofrichter J(1987)-Blood 70:1245-66
10. Gabbianelli R et al.(1997)-Free Radic.Biol.Med.23(2):278
11. Glaser V (1998)-Nature Biotechnology 16:709
12. Gonzales P et al.(1997)-J.Invest.Med.45(5):258
13. Head CA et al.(1997)-J.Clin.Invest.100,5:1193-1198
14. Joiner CH(1993)-American Journal of Physiology 264:251-70
15. Lew VL et al. (1991)-J.Clin.Invest: 87:100
16. Malik P et al.(1998)-Blood 91,8:2664-2671
17. Ming Swi Chang T (1997) - Blood substitutes, principles, methods, products and clinical trials. Karger Landes Systems: chapter 3.
18. Olukoga A.O. et al. (1990)-Journal of East African Medicine 67:348-50
19. Repka T,Hebbel RP(1991)-Blood 78(10):2753
20. Sertac A. et al.(1997)-Gen.Pharmacol. 28(3):427
21. Teng CM et al. (1996)-Eur.J.P.Pharmacol. 303(1-2):129
22. Vikinsky E et al. (1998)-Blood 92(10) suppl 1 part 2:112-135

progressi nella ricerca per la terapia genetica della β -talassemia e dell'anemia falciforme

Santina Acuto

Unità di Ricerca "Piera Cutino", A.O. "V. Cervello" Palermo

Nel volume 1, numero 3 di SO.S.T.E. Notiziario di Dicembre 1999 si riportava, in linea generale, lo stato dell'arte della terapia genetica (T.G.) per la cura della β -talassemia e dell'anemia falciforme.

L'articolo spiegava i processi biologici su cui si basa la T.G., i progressi ottenuti e le problematiche non ancora risolte nel campo specifico della T.G. per la talassemia.

Tra i maggiori ostacoli venivano annoverati: la scarsa efficienza di infezione delle particelle retrovirali ricombinanti (cioè dei retrovirus trasformati in laboratorio in vettori e contenenti il gene terapeutico), e la instabilità di queste molecole (cioè la tendenza a riarrangiare una volta introdotti nelle cellule).

Nello scorso anno sono stati pubblicati due lavori su importanti riviste internazionali che rappresentano un notevole passo avanti verso la realizzazione della T.G. per la talassemia. Il primo, uscito dal laboratorio del Dott. Philippe Leboulch, Harvard M.I.T., Cambridge, MA (C.P. Kalberer e collaboratori: P.N.A.S. vol.97, No 10, 9 Maggio 2000) contribuisce con una idea molto semplice a migliorare l'efficienza di infezione e ad evitare il silenziamento nel tempo del gene introdotto.

Gli autori costruiscono un vettore retrovirale che, oltre a contenere il gene globinico, porta anche un gene che produce una proteina verde fluorescente chiamata GFP (Green Fluorescent Protein). Questa proteina "marcatore" è in grado di fare rilevare, con una semplice osservazione al microscopio a fluorescenza le cellule che sono state trasformate dal vettore e poterne così seguire il destino nel tempo; è possibile inoltre, cosa ancora più importante, potere selezionare le cellule fluorescenti mediante un macchinario che le riconosce. Gli autori dimostrano che in questa maniera, dopo avere infettato le cellule di midollo osseo del topo in coltura e avere selezionato solo quelle fluorescenti, la reinfusione di queste nei topi porta a risultati molto buoni. Il 100% dei topi trapiantati con le cellule di midollo geneticamente modificato esprimono la proteina fluorescente ed il gene globinico umano che sta accanto. L'espressione non viene silenziata nel tempo, come avveniva negli esperimenti precedenti usando vettori retrovirali, infatti dal 20 al 95% delle cellu-

le rosse del sangue dei topi trapiantati erano fluorescenti anche dopo 9 mesi dal trapianto (tempo al quale viene pubblicato il lavoro). L'alta percentuale di cellule geneticamente modificate che persistono nel tempo viene spiegata dalla preselezione operata grazie alla proteina fluorescente. Infatti, già in coltura, prima della reinfusione nel topo, sono escluse quelle cellule che hanno integrato il vettore in posizioni cromosomiche "scomode" e pertanto destinate a far estinguere nel tempo l'espressione della proteina fluorescente e del gene terapeutico.

Il secondo lavoro che volevo portare alla vostra attenzione è stato pubblicato sulla rivista NATURE vol. 406, 6 luglio 2000 dal gruppo del Dott. Michel Sadelain in collaborazione con il Prof. Lucio Luzzatto, quest'ultimo dal 1994 dirige il dipartimento di Genetica del Memorial Sloan Kettering di New York e dal Luglio 2000 dirige l'Istituto tumori di Genova. Nel laboratorio del Dott. M.Sadelain è stato costruito un vettore lentivirale contenente il gene della β -globina (si ricorderà dall'articolo precedente di SO.S.T.E. Notiziario che i lentivirus o virus dell'HIV sono della famiglia dei retrovirus ma sono più stabili di questi ultimi per alcune loro peculiarità e sono anche in grado di trasportare una più grande quantità di DNA terapeutico). In questo vettore, oltre al gene globinico sono state clonate pezzi di DNA abbastanza grandi, contenenti sequenze regolatrici che controllano la trascrizione del gene globinico. Lo stesso Dott Sadelain, in un incontro organizzato a Roma il 22 Ottobre 2000 dalla Fondazione italiana "L. Giambrone" ha avuto modo di discutere i risultati con i medici e con le associazioni dei pazienti.

Topi eterozigoti per la β -talassemia, trapiantati con midollo osseo infettato in coltura con il lentivirus ricombinante, esibivano una percentuale di emoglobina contenente la β -globina umana tra il 17 e 24%. Questi livelli di emoglobina, se riprodotti nell'uomo sarebbero sufficienti per migliorare l'anemia in pazienti con difetti severi nella produzione di emoglobina.

Il Dott. Sadelain, pur dichiarando che ulteriori ricerche sono necessarie per perfezionare il vettore e per verificarne l'assoluta innocuità, si è detto molto fiducioso nell'uso dei lentivirus come vettori per la terapia genica della β -talassemia e dell'anemia falciforme.

Lo squid di torino

Antonio Piga

Centro Microcitemie / SQUID

*Dipartimento di Scienze Pediatriche Università di Torino
Azienda Ospedaliera O.I.R.M.- S. Anna Torino*



Il 21 Giugno 2000 è diventata operativa presso il Centro Microcitemie di Torino l'attività di Biosusctometria magnetica tramite SQUID (Superconductive QUantum Interference Device) per la determinazione non invasiva del ferro corporeo.

Si tratta di una tecnica altamente sensibile e specifica per misurare il ferro di deposito nell'organismo. Infatti mentre nel ferro funzionale ciascun atomo è isolato in strutture biologiche complesse, nel ferro di deposito (ferritina ed emosiderina) gli atomi sono molto vicini tra loro, impacchettati in granuli dotati di proprietà fisiche uniche "paramagnetismo".

Le tecniche alternative sono la biopsia epatica, invasiva e meno precisa, e la risonanza magnetica nucleare. Quest'ultima permette di esplorare organi diversi dal fegato e milza, quali cuore e pancreas, ma non è abbastanza precisa. La cosiddetta dissociazione fegato-cuore, cioè la possibilità di avere un accumulo di ferro cardiaco proporzionalmente molto diverso da quello del fegato, è stata di recente molto enfatizzata.

La disponibilità di macchine SQUID nel mondo è limitata, per i costi molto elevati e per l'alta specializzazione richiesta agli operatori. Negli ultimi 10 anni sono stati messi a punto solo due biosusctometri SQUID, a Cleveland negli Stati Uniti e ad Amburgo in Europa a cui finora dovevano ricorrere i pazienti italiani.

Lo SQUID di Torino rappresenta la nuova generazione di biosusctometri grazie al miglioramento di alcune caratteristiche tecniche che, oltre ad aumentare l'accuratezza e la precisione delle misurazioni, estendono l'applicabilità della metodica anche su bambini piccoli. In particolare, i primi risultati conseguiti con il biosusctometro di Torino, hanno confermato la semplicità, la precisione del metodo e l'ampio spettro di

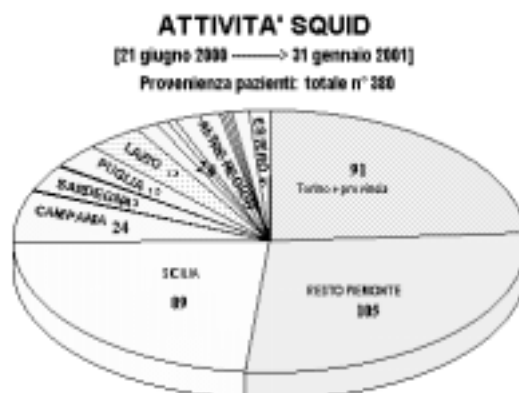
applicazioni cliniche.

La principale è la talassemia major, ove un esame SQUID periodico può essere prezioso nel regolare la terapia chelante, ottimizzando così il livello di accumulo di ferro. Utilizzando infatti solo la ferritina sierica, relativamente imprecisa, si possono erroneamente creare condizioni di sotto-chelazione o di sovra-chelazione.

Un esame SQUID può inoltre essere utile in altre patologie, quali:

- Valutazione dell'efficacia a breve medio termine di nuovi chelanti del ferro
- Determinazione dell'accumulo di ferro in pazienti con talassemia intermedia e altre emoglobinopatie (drepanocitosi, microdrepanocitosi)
- Determinazione dell'accumulo di ferro in patologie che possono comportare emosiderosi (anemie congenite, anemie aplastiche, mielodisplasie, anemie emolitiche)
- Diagnosi di emocromatosi ereditaria
- Regolazione della terapia con salassi
- Diagnosi differenziale delle iperferritinemie
- Quantificazione del ferro epatico nelle malattie di fegato
- Preparazione alle terapie antivirali nelle epatiti
- Monitoraggio del trapianto di midollo osseo
- Preparazione al trapianto di fegato e follow up post trapianto.

Attualmente, dopo 9 mesi di attività non ancora a pieno regime, sono stati esaminati circa 380 pazienti provenienti da diverse regioni italiane, alcuni dall'estero.



Lo SQUID è situato in nuovi locali appositamente costruiti. In tutte le fasi (scelta dell'area, scavi, edilizia, infrastrutture, arredi, attività) sono stati curati tutti gli accorgimenti per evitare/minimizzare l'inquinamento elettromagnetico.

L'esame SQUID può essere prenotato direttamente per telefono.

Azienda Ospedaliera O.I.R.M.- S. Anna - C.so Spezia, 60 - 10126 Torino
Università di Torino
Dipartimento di Scienze Pediatriche
Centro Microcitemie / SQUID
Responsabile Dott. Antonio Piga
Segreteria Tel. 011 3134771 (lunedì-venerdì dalle 9.00 alle 15.30)
Fax 011 3134590 - E mail: longo@pediatria.unito.it

nuovo trial l1-df

Aurelio Maggio

*Divisione di Ematologia II con Talassemia
Azienda Ospedaliera "V. Cervello" Palermo*

Uno studio multicentrico randomizzato della SO.S.T.E. in pazienti con talassemia major reclutati tra 15 centri di talassemia di tutta Italia aveva suggerito che dopo un anno di trattamento non esisteva nessuna differenza statisticamente significativa nei livelli di ferritina tra il gruppo di 73 pazienti trattati con L1 (Deferiprone) ed il gruppo di 71 pazienti trattati con Desferrioxamina.

Lo studio suggeriva, inoltre, che malgrado la presenza di un maggior numero di effetti collaterali nel gruppo trattato con L1, i due trattamenti erano ben tollerati e non veniva messo in evidenza un incremento della fibrosi epatica.

Il passo successivo che la Società per lo Studio delle Talassemie ed Emoglobinopatie si propone è duplice:

- a) andare a valutare, a questo punto, se il trattamento combinato L1-DF (L1 per 4gg. e DF per 3gg.) è più efficace del singolo trattamento;
- b) valutare l'efficacia di L1 vs. Desferal in altre emoglobinopatie come la talassemia intermedia e talassodrepanocitosi.

Lo studio multicentrico randomizzato sulla talassemia major comprende la valutazione di efficacia della terapia con L1 vs. la terapia con L1-DF (4gg. di L1 e 3gg. di DF). Potranno essere inclusi pazienti con talassemia major di età superiore ai 13 anni e con livelli di ferritina variabili tra 1000 e 3000 ng/ml. Sono stati definiti molto accuratamente i criteri di esclusione. Tra le indagini di tipo strumentale da effettuare sono previsti la RMN cardiaca ed epatica, lo SQUID, la biopsia epatica. La durata prevista dello studio è di cinque anni. E' stata prevista l'istituzione di un comitato scientifico esterno, designato dal comitato etico del centro coordinatore, per la valutazione "ad interim" dei risultati.

Gli studi multicentrici randomizzati sulla talassemia intermedia e sulla falcemia e/o talassodrepanocitosi sono stati, invece, disegnati per valutare la differenza di efficacia tra i due trattamenti singoli L1 vs. DF. Saranno inclusi pazienti con livelli di ferritina tra 800 e 3000 ng/ml di età superiore ai 13 anni e con diagnosi certa di talassemia intermedia e falcemia o talassodrepanocitosi. Anche per questi pazienti è previsto un follow-up clinico e strumentale accurato che prevede, tra le diverse indagini, la RMN, lo SQUID, la biopsia epatica. Sono stati identificati con molta accuratezza i criteri di esclusione e di riduzione o sospensione della terapia.

E' possibile avere più notizie richiedendo l'invio dei protocolli clinici al Dr. Manlio Panzanella (Cell. 0339-7740151) o al Dr. Paolo Rigano (Tel. 091-6802795) della Divisione di Ematologia II con Talassemia dell'Azienda Ospedaliera "V. Cervello" di Palermo. Una volta effettuata la randomizzazione verranno inviate le schede raccolte dati dal centro coordinatore.

SO.S.T.E. Notiziario

Organo ufficiale della Società per lo Studio delle Talassemie ed Emoglobinopatie - SO.S.T.E. - quadrimestrale -

Direttore Responsabile: *Dott. Vincenzo Caruso*

Amministrazione e Redazione

Società per lo Studio delle Talassemie ed Emoglobinopatie - SO.S.T.E.

<i>Dott. Carmelo Magnano</i>	Presidente
<i>Dott. Aurelio Maggio</i>	V. Presidente
<i>Prof. Felicia Di Gregorio</i>	Tesoriere
<i>Dott. Marcello Capra</i>	Consigliere
<i>Dott. Turi Lombardo</i>	Consigliere
<i>Dott. Roberto Malizia</i>	Consigliere
<i>Dott. Michele Rizzo</i>	Consigliere
<i>Dott. Vincenzo Caruso</i>	Segretario

c/o Servizio di Talassemia - Ospedale "Garibaldi"
Piazza S. Maria di Gesù, 7 - 95124 Catania

- Tel. 095.7594312 - 4246
- Fax 095.7592023
- E-mail: sosteth@tin.it
- Cod. Fisc.: 93080860872
- Coord. Bancarie: 1005 16903 10181

Stampa *Tipolitografia Lo Faro Domenico*
Via Canfora, 2/b - Catania

Registrazione presso il Tribunale di Catania
N. 12/99 del 6/5/1999