

# LA TERAPIA GENICA DEL DIABETE MELLITO DI TIPO 1

L. FALQUI

Divisione di Medicina, Istituto San Raffaele Telethon per la Terapia Genica (HSR-TIGET),  
Istituto Scientifico Universitario San Raffaele, DIBIT, Milano

Nel corso degli ultimi anni l'avanzamento delle conoscenze nel campo della genetica e, in particolare, il progresso delle metodologie per il trasferimento e l'espressione di geni terapeutici in cellule e/o tessuti umani ha consentito di estendere le prospettive di applicazione della terapia genica a un sempre maggior numero di malattie, sia congenite monogeniche che acquisite. A oggi, infatti, più di 3500 pazienti, suddivisi in circa 500 *clinical trials*, sono stati sottoposti a procedure di terapia genica per diverse patologie, tra cui le immunodeficienze congenite, la fibrosi cistica, l'emofilia B, l'ipercolesterolemia familiare, il deficit di ornitilcarbamiltransferasi e diverse forme di neoplasie (1).

Per terapia genica s'intende oggi una procedura terapeutica basata sul trasferimento di materiale genetico (DNA o RNA) nelle cellule somatiche di un paziente, rivolta alla correzione di un difetto genetico congenito o acquisito, o indirizzata a conferire una nuova funzione a cellule o tessuti non deputati a questo scopo. È proprio questa seconda finalità che potrebbe trovare un'applicazione nella cura del diabete di tipo 1, in cui l'obiettivo terapeutico è quello di sostituire una funzione – la capacità di produrre insulina e rilasciarla nel circolo ematico sulla base delle necessità metaboliche – andata perduta per la distruzione delle beta cellule pancreatiche nel corso di un processo autoimmunitario.

Attualmente quest'obiettivo terapeutico può essere ottenuto mediante il trapianto di pancreas vascolarizzato (2) o l'impianto intra-epatico d'isole di Langherans, isolate da più pancreas di donatori cadaveri (3). Queste procedure sono indubbiamente in grado di condurre a un controllo metabolico impensabile con la terapia insulinica tradizionale. Purtroppo, gli effetti collaterali della terapia immunosoppressiva permanente (4) e, soprattutto, la ridotta disponibilità d'organi da trapiantare, limitano l'applicazione di queste procedure a un'esigua minoranza di pazienti diabetici.

Obiettivo principale della terapia genica è quello di generare cellule capaci di secernere insulina umana in modo regolato in risposta alle esigenze metaboliche. È però anche necessario sviluppare procedure in grado di generare quantità rilevanti di tali "beta cellule surrogate o sostitutive", per poter proporre questa terapia a un più numeroso gruppo di soggetti diabetici. Infine, sarebbe certamente preferibile sviluppare "beta cellule sostitutive" da cellule umane autologhe, appartenenti al paziente diabetico stesso. In questo modo sarebbe possibile evitare, almeno in linea di principio, la necessità di immuno-sopprimere il paziente o di ricorrere a dispositivi di immuno-isolamento per segregare il tessuto trapiantato dal sistema immunitario dell'ospite.

Esistono oggi due possibili strategie di terapia genica per generare "beta cellule surrogate o sostitutive". Questi due approcci differiscono in numerosi aspetti sostanziali.

Una strategia si propone la trasformazione di linee beta-cellulari di origine animale, principalmente murina, in cellule con caratteristiche adatte alle esigenze terapeutiche umane. Questo approccio offre il grande vantaggio di utilizzare cellule con una capacità di crescita praticamente illimitata, espandibili quindi in coltura in quantitativi adatti a un esteso impiego. Un'altra caratteristica vantaggiosa di queste cellule è la loro origine beta-cellulare che mantiene in esse funzionale il programma genetico della secrezione granulare regolata. Una proprietà specifica delle cellule endocrine è infatti quella di accumulare proteine all'interno di granuli. Nel granulo, l'ormone è sottoposto a modificazioni post-traduzionali, nel caso particolare alla processazione da proinsulina a insulina matura a opera delle proteasi specifiche PC<sub>2</sub> e PC<sub>3</sub>. I granuli sono poi sottoposti a movimento nel citoplasma fino alla membrana cellulare, ancoraggio a essa e rilascio all'esterno del contenuto ormonale sotto il preciso controllo di una complessa serie di stimoli fisiologici. Questo meccanismo complesso non

è stato ancora completamente decifrato, e la sua ricostruzione in cellule non-endocrine non è ancora alla portata delle attuali tecnologie di ingegneria genetica. È evidente quindi che la possibilità di regolare la secrezione di insulina attraverso granuli di esocitosi rappresenta uno dei punti di forza di questa strategia. Tuttavia, la risposta secretiva naturale di queste cellule è largamente diversa da quella richiesta per un impiego clinico. Innanzi tutto, queste cellule rilasciano insulina murina. Inoltre, il rilascio di insulina dai granuli è massimo per concentrazioni di glucosio nell'ordine delle micro-moli, e non, come necessario per prevederne un impiego terapeutico, in un intervallo da 3,3 a 16,7 millimolare (~60-300 mg/dL). Queste cellule devono perciò essere rese simili alle beta-cellule umane mediante un processo di ingegneria genetica multipla definito di *iterative engineering* (5). Con tale termine si indica che un intero gruppo di geni murini deve essere progressivamente eliminato (*knocking-out*) e sostituito stabilmente con quei geni umani che inducono le funzioni desiderate. In tale rimaneggiamento genetico è compreso l'inserimento dei geni per il glucotrasportatore GLUT-2, e per l'enzima fosforilante il glucosio *glucochinasi*. È poi necessario sopprimere la produzione di (pro)insulina murina e ottenere la produzione di insulina umana. Questo laborioso rimaneggiamento genetico è teoricamente alla portata delle tecnologie e delle risorse disponibili, e ha già prodotto alcuni risultati significativi, tra i quali il più rilevante appare il ripristino della soglia di massima sensibilità al glucosio nell'intervallo fisiologico, tra 3,3 e 16,7 millimolare (6, 7). È quindi realistico pensare che venga condotta a termine la cosiddetta "umanizzazione" delle beta-cellule murine, intendendo con questo unicamente l'adattamento delle capacità secretive all'impiego nell'uomo. Il vero limite di questa strategia è la necessità di contenere tali cellule in sistemi chiusi, quali le microcapsule, per evitare che la loro origine xenogenica ne comporti il rigetto, o che, in uno scenario ancora peggiore, una volta sfuggite al riconoscimento da parte del sistema immunitario umano, queste cellule continuino a proliferare in modo incontrollato, disseminandosi nell'ospite. Sfortunatamente, nonostante più di venti anni di ricerche in questo settore, la tecnologia dell'incapsulamento cellulare non ha ancora sviluppato materiali e strutture con caratteristiche di sicurezza, stabilità, e permeabilità selettiva tali da essere proposti per questo specifico impiego in sperimentazioni cliniche (8, 9).

L'alternativa all'utilizzo di cellule di provenienza murina "umanizzate" consiste nell'ingegnerizzazione di cellule o tessuti autologhi, appartenenti o provenienti

dal paziente diabetico medesimo, per svilupparvi la capacità di sintetizzare insulina e rilasciarla in modo regolato. In questo modo non sarebbe necessario né immuno-isolare le cellule né trattare i pazienti con farmaci anti-rigetto. È inoltre possibile che queste cellule possano sfuggire alla recidiva dell'attacco autoimmune, perché di origine diversa dalle beta-cellule.

Gli ostacoli che questa strategia deve affrontare sono numerosi. Uno è costituito dall'assenza nelle cellule non-endocrine delle endoproteasi PC<sub>2</sub> e PC<sub>3</sub>, che operano la conversione della proinsulina, biologicamente poco attiva, in insulina matura. Questa limitazione è stata brillantemente superata mediante modificazione genetica della molecola della proinsulina. Mediante sostituzione di un aminoacido nella catena B (lisina 29 in arginina) e di uno nel C-peptide (leucina 62 in arginina) sono state generate le sequenze aminoacidiche processabili dalla furina, una proteasi a presenza ubiquitaria (10). È stato dimostrato che il trasferimento del gene della proinsulina umana furino-sensibile (FurHPI) induce la sintesi di fur-proinsulina in svariati tipi cellulari non-endocrini, quali fibroblasti, miociti e epatociti, e che essa viene processata e rilasciata come insulina matura (11,12). Inoltre, questa modificazione nella sequenza aminoacidica avviene in una porzione terminale della catena B e quindi non condiziona una differente attività biologica rispetto all'insulina naturale. Un secondo, e più complesso problema, deriva dall'assenza nelle cellule non-endocrine del meccanismo di secrezione granulata regolata. Per regolare la secrezione di insulina è quindi necessario agire a livello della sintesi della proteina, sviluppando un sistema che riconosca le variazioni di glicemia e agisca a livello della trascrizione del gene trasferito. Nella ricerca di una cellula capace di offrire caratteristiche vantaggiose per questa finalità, il candidato più attraente è costituito dall'epatocita, poiché possiede naturalmente le molecole GLUT-2 e *glucochinasi*, che costituiscono il sistema glucocettore utilizzato proprio dalle beta-cellule per adeguare la secrezione insulinica alle variazioni glicemiche (12). Un'ulteriore caratteristica vantaggiosa degli epatociti è la capacità di auto-regolare l'espressione di alcuni geni, che codificano per enzimi coinvolti nella glicolisi o nella sintesi degli acidi grassi, in risposta alle concentrazioni di glucosio (13,14). Questo è dovuto alla presenza di promotori, o elementi di regolazione, responsivi alle variazioni dei substrati stessi. Numerosi lavori sperimentali dimostrano che questi promotori sono in grado di indurre una sintesi regolata da glucosio di diverse proteine in cellule epatiche *in vitro* (15).

La prima dimostrazione di come sia possibile ottene-

re una produzione di insulina regolata dalla glicemia mediante terapia genica *in vivo* è stata recentemente fornita dal gruppo di Yoon (16). Questo gruppo ha indotto la remissione del diabete in modelli murini mediante iniezione di un vettore virale, in cui la produzione di una insulina-analogo, a catena singola, era posta sotto il controllo di un promotore epatico glucosio-sensibile. Tale analogo dell'insulina ritiene solo il 20-40% di attività rispetto all'insulina nativa, ma non richiede una processazione proteasica. Il controllo trascrizionale glucosio-indotto, pur inducendo una sintesi di questa insulina-analogo nettamente ritardata (2-4 ore) rispetto alla fisiologica secrezione esocitotica, si è dimostrato in grado di controllare la glicemia post-prandiale in assenza di ipoglicemia franca. Ovviamente, gli effetti metabolici descritti necessitano di approfondimenti e di una conferma in un modello animale più vicino all'uomo, quale per esempio il cane o la scimmia. L'aspetto che maggiormente andrà approfondito è il rischio di indurre ipoglicemia durante il digiuno. Gli effetti metabolici di elevati livelli locali di insulina sugli epatociti dovranno inoltre essere verificati. È ovvio che una simile procedura di terapia genica dovrà offrire le più ampie garanzie di sicurezza oltre che di efficacia terapeutica prima di poter essere applicata all'uomo. I maggiori sforzi vengono pertanto attualmente indirizzati alla identificazione e/o generazione di elementi trascrizionali o post-trascrizionali che conferiscano una cinetica di secrezione insulinica il più simile a quella fisiologica, sia in termini di induzione che di spegnimento dello stimolo. Accanto a questo, un differente meccanismo di sicurezza dovrà essere fornito dalla possibilità di eliminare le cellule produttrici di insulina, in caso che i livelli di ormone superassero comunque quelli necessari. Questo sistema di sicurezza è attualmente ottenibile attraverso la co-espressione di un gene "suicida" (17, 18), che conduce all'apoptosi delle cellule geneticamente modificate in seguito alla somministrazione esogena di un farmaco. Ottenuti questi risultati, la procedura di trasferimento genico rivelatasi più sicura ed efficace in modelli animali rilevanti potrà allora essere proposta per i primi studi clinici.

## Bibliografia

1. The Journal of Gene Medicine Website: <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/>
2. Gruessner AC, Sutherland DE: Analyses of pancreas transplant outcomes for United States cases reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and non-US cases reported to the International Pancreas Transplant Registry (IPTR). *Clin Transpl* 51-69, 1999
3. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV: Islet transplantation in seven patients with Type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 343, 230-238, 2000
4. Martinenghi S, Dell'Antonio A, Di Carlo V, Pozza G, Secchi A: Cancer arising in a series of diabetic patients etc. *Diabetes Care* 20, 272-275, 1997
5. Clark SA, Quaade C, Constandy H, Hansen P, Halban P, Ferber S, Newgard CB: Novel insulinoma cell lines produced by *iterative engineering* of GLUT-2, glucokinase and human insulin expression. *Diabetes* 46, 958-967, 1997
6. Efrat S, Leiser M, Surana M, Tal M, Fusco-Demane D, Fleisher N. Murine insulinoma cell line with normal glucose-regulated insulin secretion. *Diabetes* 42, 901-907, 1993
7. Tiedge M, Elsner M, McClenaghan NH, Hedrich HJ, Grube D, Klempnauer J, Lenzen S: Engineering of a glucose-responsive surrogate cell for insulin replacement therapy of experimental insulin-dependent diabetes. *Hum Gene Ther* 10, 403-414, 2000
8. Trivedi N, Keegan M, Steil GM, Hollister-Lock J, Hasenkamp WM, Colton CK, Bonner-Weir S, Weir GC: Islets in alginate macrobeads reverse diabetes despite minimal acute insulin secretory response. *Transplantation* 71, 203-211, 2001
9. Calafiore R, Basta G, Luca G, Boselli C, Bufalari A, Bufalari A, Cassarani MP, Giustozzi GM, Brunetti P: Transplantation of pancreatic islets contained in minimal volume microcapsules in diabetic high mammals. *Ann NY Acad Sci* 875, 219-232, 1999
10. Groskreutz DJ, Sliwkowski MX, Gorman CM: Genetically engineered proinsulin constitutively processed and secreted as mature, active insulin. *J Biol Chem* 269, 6241-6245, 1994
11. Falqui L, Martinenghi S, Severini GM, Corbella P, Taglietti MV, Arcelloni C, Saruger E, Monti LD, Paroni R, Dozio N, Pozza G, Bordignon C: Reversal of diabetes in mice by implantation of human fibroblasts genetically engineered to release mature human insulin. *Human Gene Therapy* 10, 1753-1762, 1999
12. German MS: Glucose sensing in pancreatic islet beta cells: the key role of glucokinase and the glycolytic intermediates. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 1781-1785, 1993
13. Towle H: Metabolic regulation of gene transcription in mammals. *J Biol Chem* 270, 23235-23238, 1995
14. Vaulont S, Kahn A: Transcriptional control of metabolic regulation genes by carbohydrates. *FASEB Journal* 8, 28-35, 1994
15. Chen R, Doiron B, Kahn A: Glucose responsiveness of a reporter gene transduced into hepatocytic cells using a retroviral vector. *FEBS Letters* 365, 223-226, 1995
16. Lee HC, Kim S-J, Kim K-S, Shin H-C, Yoon J-W: Remission in models of type 1 diabetes by gene therapy using a single-chain insulin analogue. *Nature* 408, 483-488, 2000

17. Bonini C, Ferrari G, Verzeletti S, Servida P, Zappone E, Ruggieri L, Ponzoni M, Rossini S, Mavilio F, Traversari C, Bordignon C: HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* **276**, 1719-1724, 1997
18. Thomis DC, Markt S, Bonini C, Traversari C, Gilman M, Bordignon C, Clackson T: A Fas-based suicide switch in human T cells for the treatment of graft-versus-host disease. *Blood* **97**, 1249-1257, 2001

---

*Corrispondenza a: Dott. Luca Falqui, Divisione di Medicina, Istituto San Raffaele Telethon per la Terapia Genica (HSR-TIGET), Istituto Scientifico Universitario San Raffaele, DIBIT, Via Olgettina 58, 20132 Milano  
e-mail: luca.falqui@hsr.it*

*Pervenuto in Redazione il 21/6/2001 - Accettato per la pubblicazione il 25/6/2001*