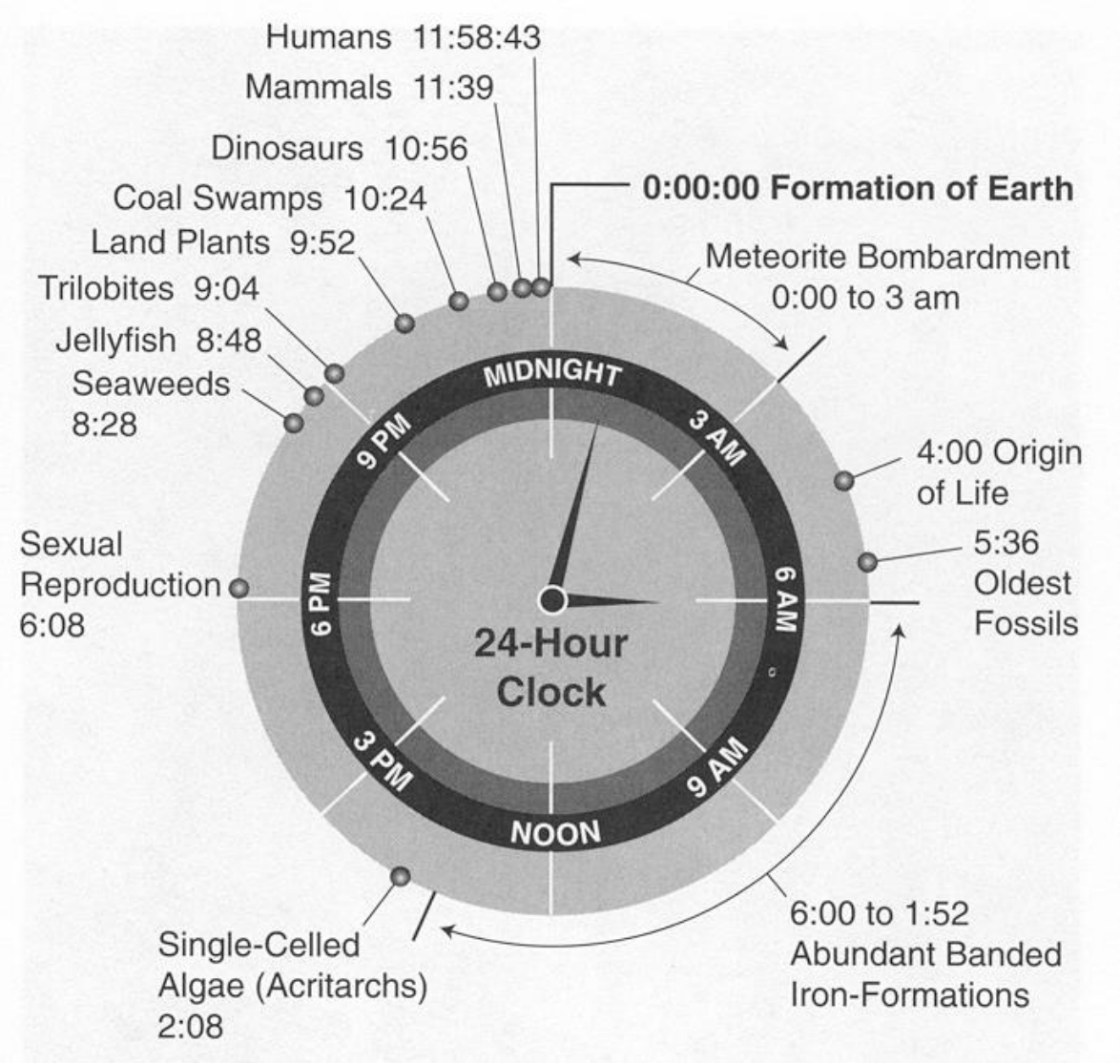
IMPORTANZA DEI MODELLI ANIMALI PER IL PROGRESSO DELLA CONOSCENZA E DEL TRATTAMENTO DELLA GLICOGENOSI 1 A

Rimini 21 Maggio 2011



Luigi Varesio

BIODIVERSITA’

MUSKOX
(OVIBOS MOSCHATUS)

HERMIT CRAB
(COENOBITA SP.)

EYELASH VIPER
(BO THRIECHIS SCHLEGELII)

EASTERN SCREECH-OWL
(MEGASCOPS ASIO)

MOON JELLIES
(AURELIA AURITA)

KATYDID
(ORCHELIMUM SP.)

JUNGLE NYMPH WALKING STICK
(HETEROPTERYX DILATATA)

AFRICAN PYGMY HEDGEHOG
(ATELERIX ALBIVENTRIS)

AFRICAN ELEPHANT
(LO XODONTA AFRICANA)

BLACK SWALLOWTAIL BUTTERFLY
(PAPILIO POLYXENES)

VIETNAMESE MOSSY FROG
(THELODERMA CORTICALE)

GOLDEN LION TAMARIN
(LEONTOPITHECUS ROSALIA)

BONGO
(TRAGELAPHUS EURYCERUS)

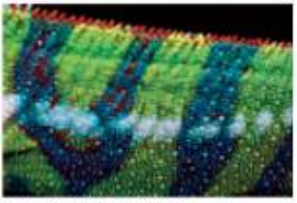
FLORIDA SCRUB MILLIPEDE
(FLORIDOBOLUS PENNERI)

FIVE-LINED SKINK
(PLESTIODON SP.)

PALLID BAT
(ANTROZOUS PALLIDUS)

BLACK LEMUR
(EULEMUR MACACO)

LEMUR LEAF FROG
(HYLOMANTIS LEMUR)



PANTHER CHAMELEON
(FURCIFER PARDALIS)

PALM COCKATOO
(PROBOSCIGER ATERRIMUS)

GREEN TREE PYTHON
(MORELIA VIRIDIS)

SILVER-STRIPED HAWK MOTH
(HIPPOTION CELERIO)

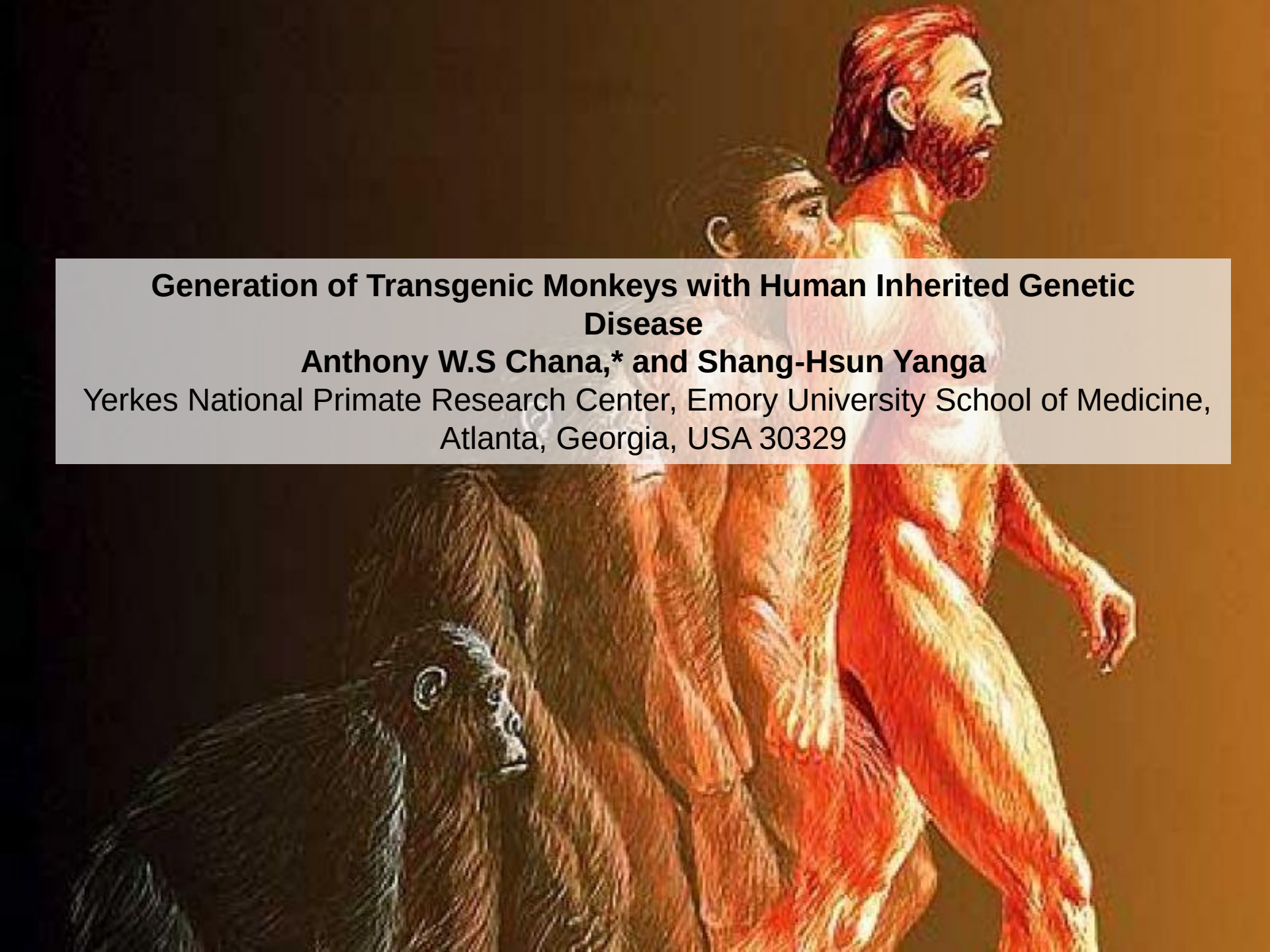
Life would be simpler if all species wore name tags. And in a way, they do. Turns out they’ve got a bar code in their DNA.

HAWKSBILL TURTLE
(ERETMOCHELYS IMBRICATA)

COYOTE
(CANIS LATRANS)

LITTLE GREENBUL
(ANDROPADUS VIRENS)

TIGER
(PANTHERA TIGRIS)



Generation of Transgenic Monkeys with Human Inherited Genetic Disease

Anthony W.S Chana,* and Shang-Hsun Yanga

Yerkes National Primate Research Center, Emory University School of Medicine, Atlanta, Georgia, USA 30329

CENTRO CONGRESSI PALAZZO DELLE STELLINE
C.so Magenta, 61 - MILANO

INTERNATIONAL MEETING GLYCOGEN STORAGE DISEASES ASSOCIATIONS

TITLE : STATE OF CLINICAL AND EXPERIMENTAL RESEARCH FOR GLYCOGENOSE TYPE 1 AND 3

SATURDAY OCTOBER 2, 2010 - 10 ,00 A.M.

MEETING INTRODUCTION - Dr. Fabrizio Seidita - President A.I.G. - Italy

FIRST SESSION:

THE ASSOCIATIONS IN EUROPE: *Presentation of individual Associations : Italy(Mrs. Angela Tritto Mazzotti), Spain(Dr.Alberto Molares), France(Dr. Philip Maes), Germany (Dr. Ute Stachelhouse), Florida (Dr.Andrew O'Toole)*

11,00 A.M. – SECOND SESSION *:* ***Experimental models glycogenose 1 and 3***

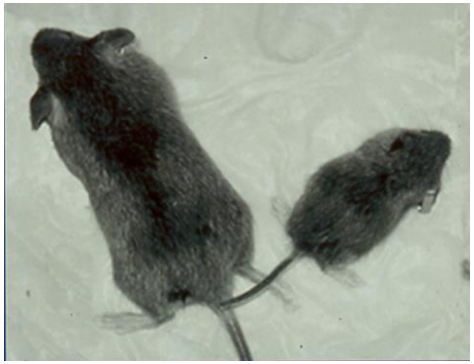
-Gene therapy correction in the liver-specific GSD1(a mouse model by Dr. Fabienne Rajas – Head of research - INSERM Research Institute-Lyon)

-The knock out mouse model of GSD1a: use in gene and cellular therapy studies. (Prof. Luigi Varesio – Gaslini Hospital – Genova

-Canine model of glycogen storage disease type 1A (Prof. D. Weinstein- Director Glycogen Storage Disease Program- Associate Professor University of Florida College of Medicine)

1. Topo knock-out

J.Y. Chou, NIH

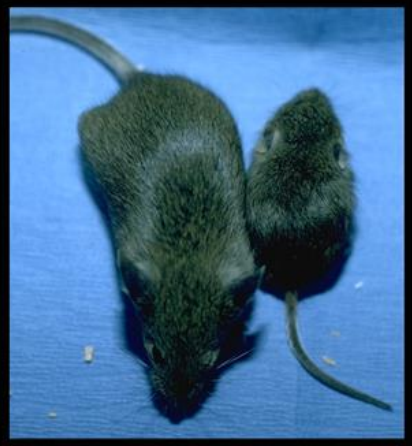


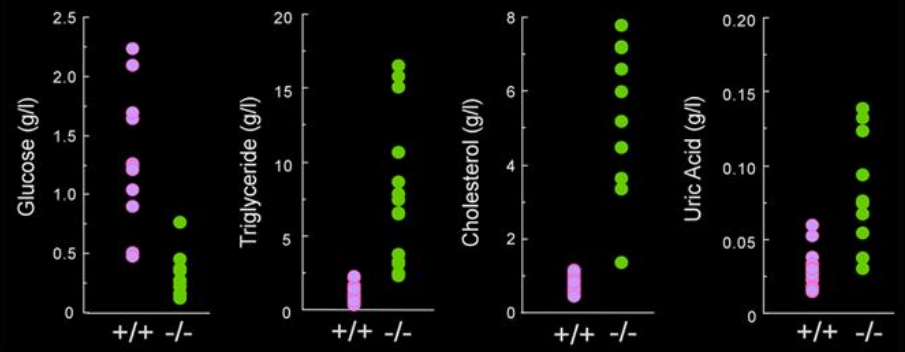
Caratteristiche:

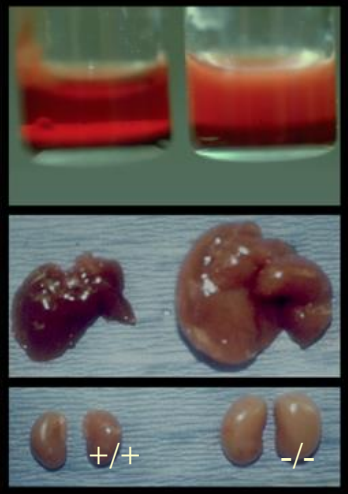
- Animali molto piccoli, fragili, alta mortalità.
- Per mantenerli in vita vanno trattati ogni 12 ore con iniezioni di glucosio.
- Manifesta la maggioranza dei segni clinici e della patologia associata alla condizione umana.
- Non manifestano acidosi lattica prima delle 6 settimane di età.
- Basso numero di animali malati nati vivi.

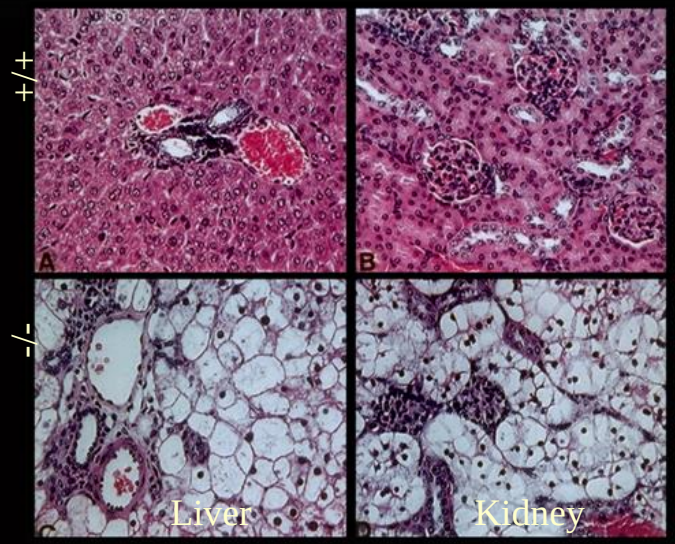
1. Topo knock-out (J.Y. Chou, NIH,USA)

- Animali molto piccoli, fragili, alta mortalità.
- Per mantenerli in vita vanno trattati ogni 12 ore con iniezioni di glucosio.
- Simile alla patologia associata alla condizione umana.
- Non manifestano acidosi lattica prima delle 6 settimane di età.
- Basso numero di animali malati nati vivi.









Slide of Dr. Janice Chou

Modelli animali murini

Modello Murino	Similarità con patologia umana	Praticità del modello	Approccio terapeutico	Costo
KO **J.Y. Chou** **Mutazione in tutti gli organi alla nascita**	**Molto buona.** Eliminazione della G6Pasi da tutti gli organi.	**Difficoltà di gestione** **(**alta mortalità, pochi topi trattabili).	**Virale e cellulare.** Difficoltà di intervento su tutti gli organi interessati**.**	**Medio/alto**
KO condizionale **J.Y. Chou e L. Varesio** **La mutazione della G6pasi viene indotta in utero e solo nel fegato.**	**Parziale.** Solo il fegato è interessato.	**Molto buona** **(**animali vitali e fecondi).	**In corso di studio.** Limitato al fegato**.**	**Medio/basso**
KO condizionale inducibile **G. Mithieux e F. Rajas** **La mutazione della G6pasi viene indotta dopo la nascita e solo nel fegato**	**Modesta.** Solo il fegato è interessato ma dalle 6 settimane di vita in poi.	**Molto buona** (animali vitali e fecondi).	**In corso di studio.** Limitato al fegato	**Medio/basso**

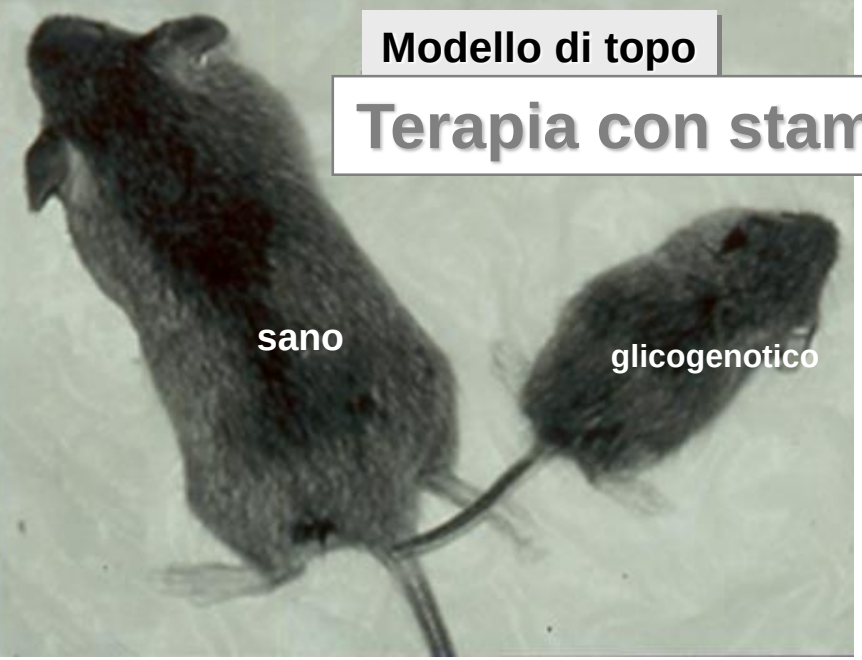
Terapia genica/cellulare in topi KO

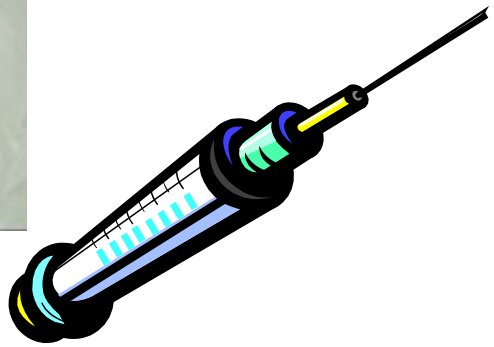
Trattamento	Gruppo	fegato	Rene	Durata
AdV	Chou	+	+	1 mese
AdV+AdAss	CHou	+	+	<12 mesi
AdAss 1	Chou	+	+	<11 mesi
AdAss 8	Chou Rajas Weinstein	+	-	> 12 mesi
FIV	Galun	+	?	>6 mesi
Staminali ematopoietiche	Varesio	+	-	> 2 mesi

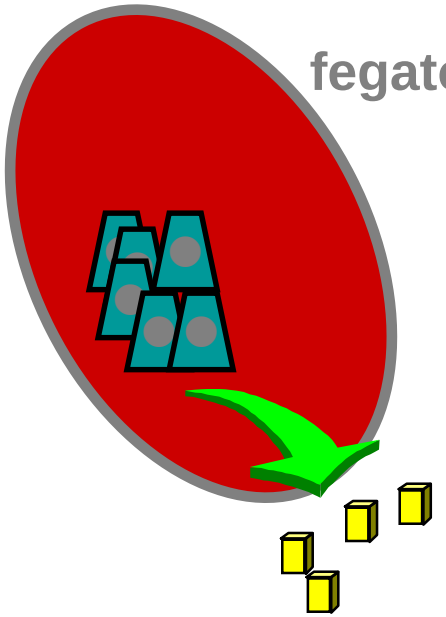
AdV = Adenovirus; AdAss = Adeno associato; FIV = Immunodeficienza felina

Modello di topo

Terapia con staminali della glicogenosi 1a







Cellule staminali ematopoietiche

Iniezione nel fegato di cellule staminali derivate dal midollo osseo

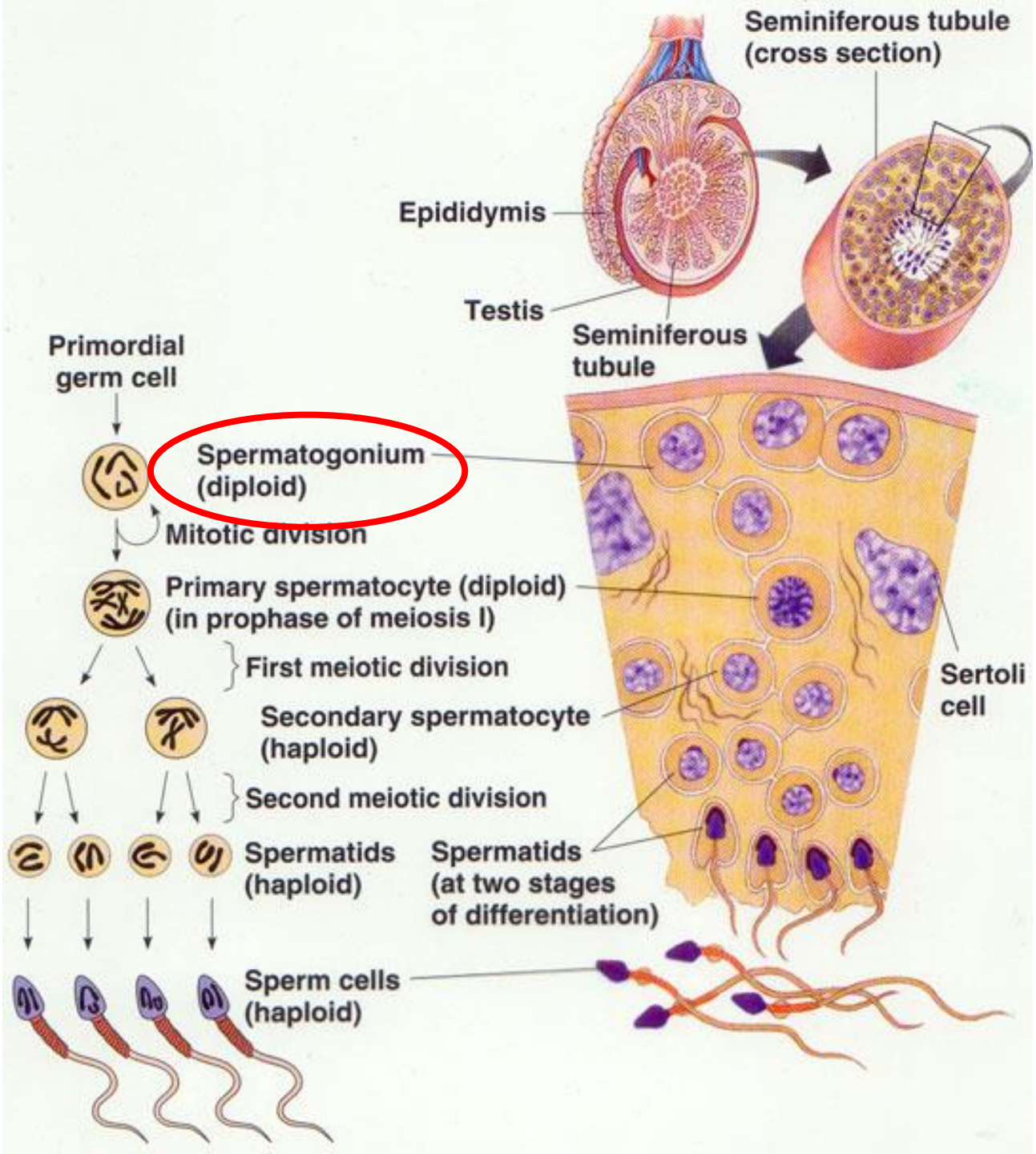
Analisi istochimica dell'attività G6Pasi

	Topi normali	G6pc-/- non trattati	G6pc-/- trattati
14 giorni			

CONCLUSIONI

IL TRATTAMENTO CON CELLULE STAMINALI HA EFFETTO SOLO SUL FEGATO E DETERMINA:

- **il miglioramento dei parametri metabolici (glicemia, colesterolo, trigliceridi, ALT, AST).**
- **Il prolungamento della vita dei topi.**
- **attività G6Pasi.**
- **il miglioramento della struttura epatica e della morfologia degli epatociti.**


Seminiferous tubule
(cross section)
Epididymis
Testis
Seminiferous
tubule
Primordial
germ cell
Spermatogonium
(diploid)
Mitotic division
Primary spermatocyte (diploid)
(in prophase of meiosis I)
First meiotic division
Secondary spermatocyte
(haploid)
Second meiotic division
Spermatids
(haploid)
Spermatids
(at two stages
of differentiation)
Sertoli
cell
Sperm cells
(haploid)

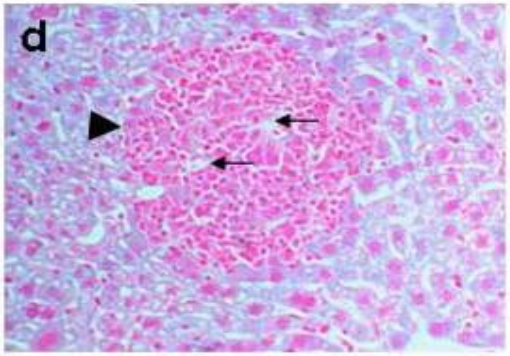
Le cellule staminali spermatogoniali pluripotenti per la terapia cellulare della Glicogenosi 1a

- **Nel testicolo adulto sono presenti cellule staminali spermatogoniali (staminali adulte).**

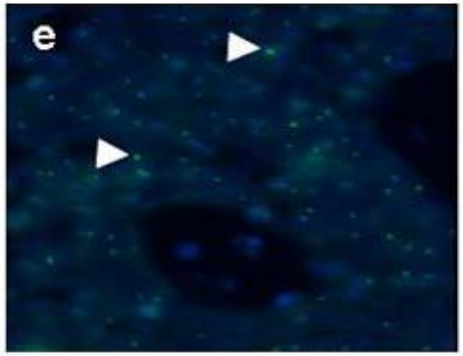
- **Le cellule staminali spermatogoniali si possono prelevare da biopsie testicolari di uomo o di topo e far differenziare in cellule staminali pluripotenti che hanno caratteristiche morfologiche e funzionali simili alle cellule staminali embrionali.**

- **Queste cellule possono essere indotte a differenziare in vitro in epatociti funzionali.**

- **Questi epatociti possono essere trapiantati nei topi KO che costituiscono il modello animale della GSD1a umana e valutarne l'effetto terapeutico.**



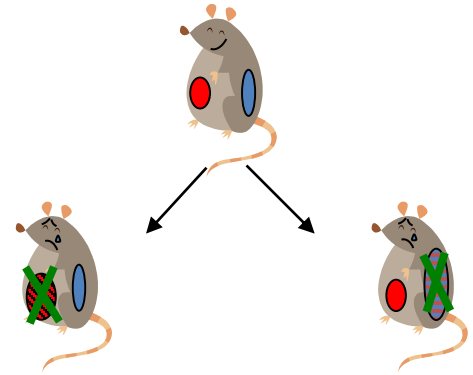
Fegato trattato con cellule spermatogoniali staminali



Le cellule inoculate contengono il cromosoma Y

Studi in collaborazione con F. Altruda, Università di Torino.

2. Topo knock-out condizionale



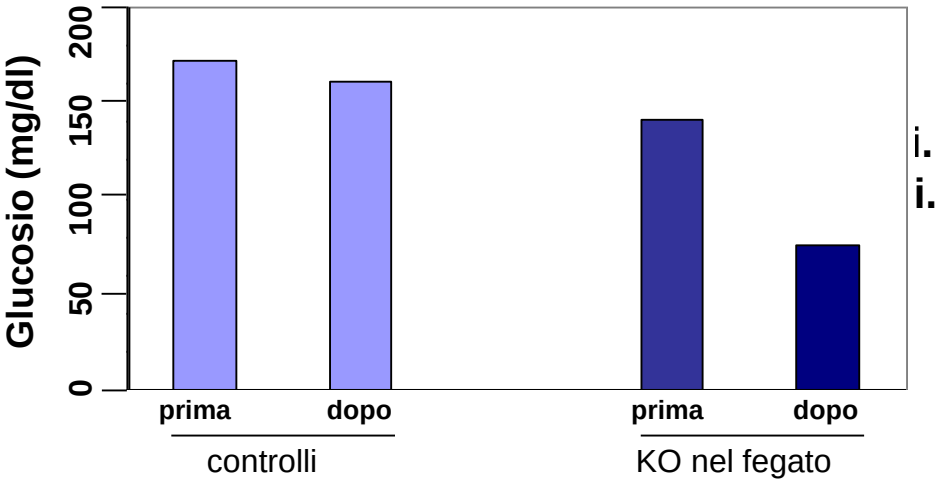
Topo KO solo fegato

Topo KO solo rene

Ottenuto una colonia vitale di topi KO solo nel fegato (L. Varesio).

In preparazione (J.Y. Chou).

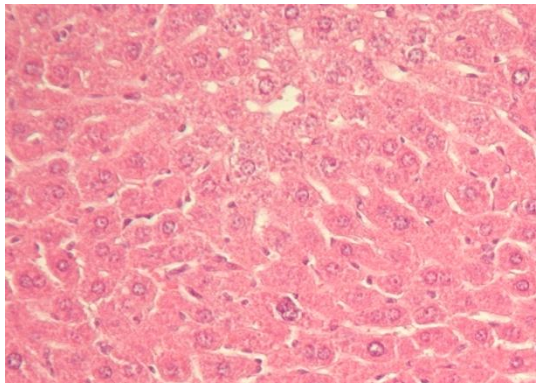
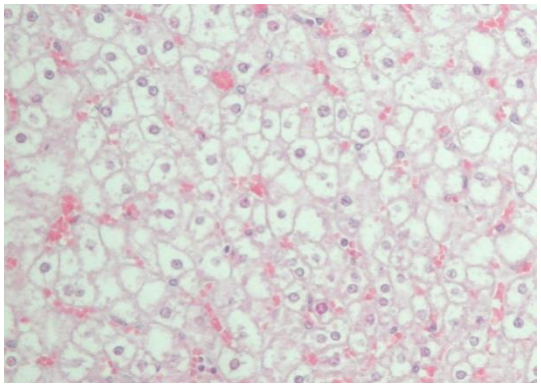
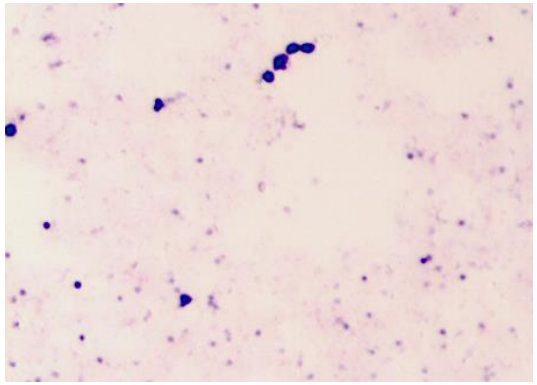
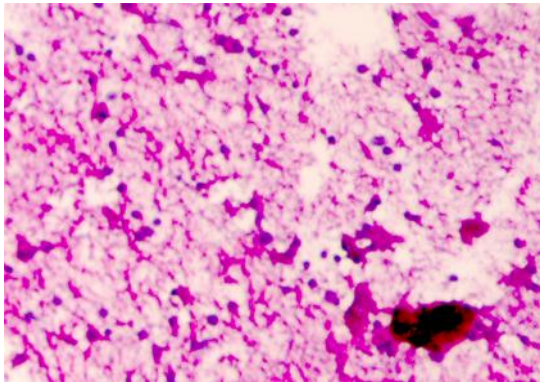
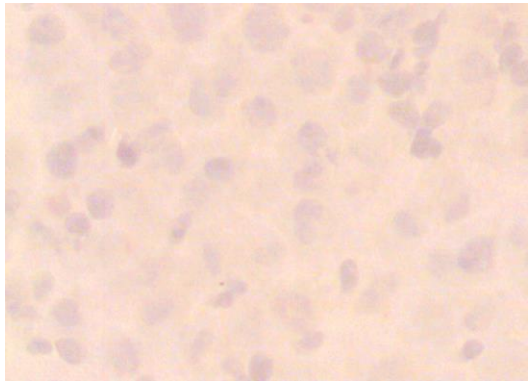
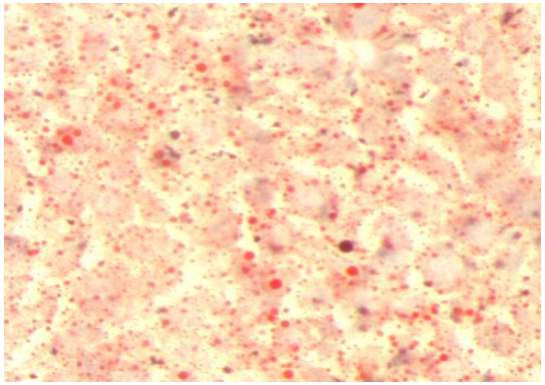
Glicemia prima e dopo digiuno



i.

i.

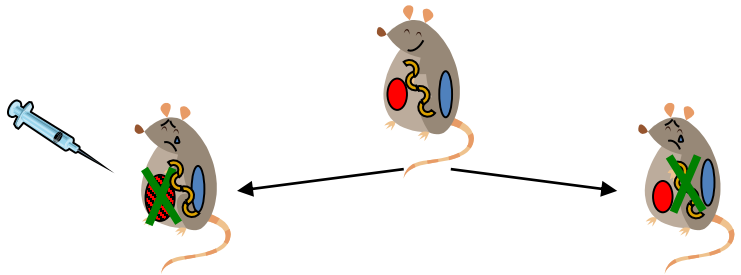
ALTERAZIONI EPATICHE

Topi normali	Topi malati	
		**Istologia**
		**Accumulo glicogeno**
		**Accumulo lipidi**

Modelli animali murini

Modello Murino	Similarità con patologia umana	Praticità del modello	Approccio terapeutico	Costo
KO **J.Y. Chou** **Mutazione in tutti gli organi alla nascita**	**Molto buona.** Eliminazione della G6Pasi da tutti gli organi.	**Difficoltà di gestione** (alta mortalità, pochi topi trattabili).	**Virale e cellulare.** Difficoltà di intervento su tutti gli organi interessati.	**Medio/alto**
KO condizionale **J.Y. Chou e L. Varesio** **La mutazione della G6pasi viene indotta in utero e solo nel fegato.**	**Parziale.** Solo il fegato è interessato.	**Molto buona** (animali vitali e fecondi).	**In corso di studio.** Limitato al fegato.	**Medio/basso**
KO condizionale inducibile **G. Mithieux e F. Rajas** **La mutazione della G6pasi viene indotta dopo la nascita e solo nel fegato**	**Modesta.** Solo il fegato è interessato ma dalle 6 settimane di vita in poi.	**Molto buona** (animali vitali e fecondi).	**In corso di studio.** Limitato al fegato	**Medio/basso**

3. Topo knock-out condizionale inducibile (Mithieux G. e Rajas F.)



Topo KO solo fegato

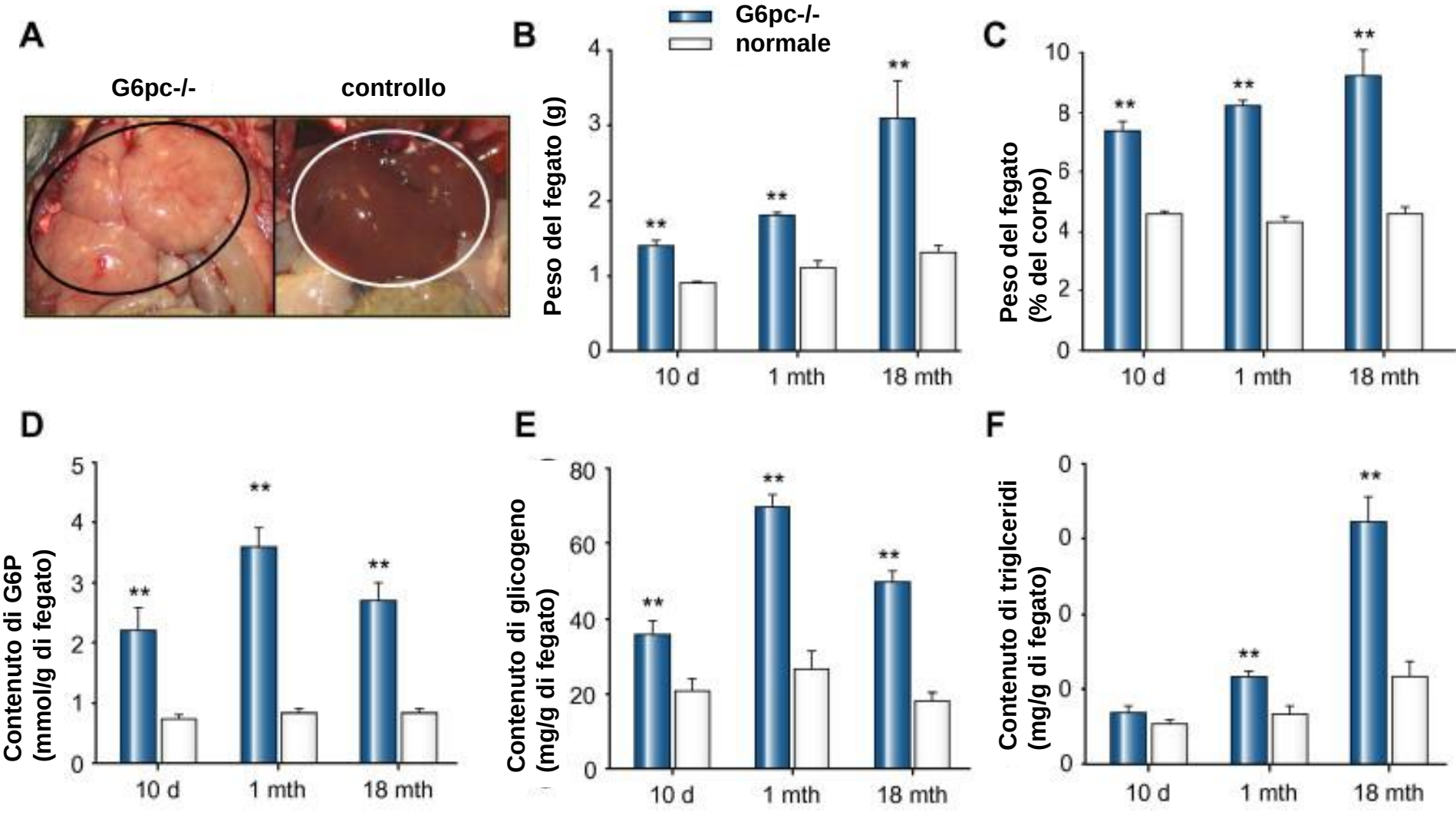
Topo KO solo intestino (In corso di studio)

- **Alla nascita i topi sono normali.**
- **A 6 settimane dalla nascita viene inattivato il gene per la G6pasi.**

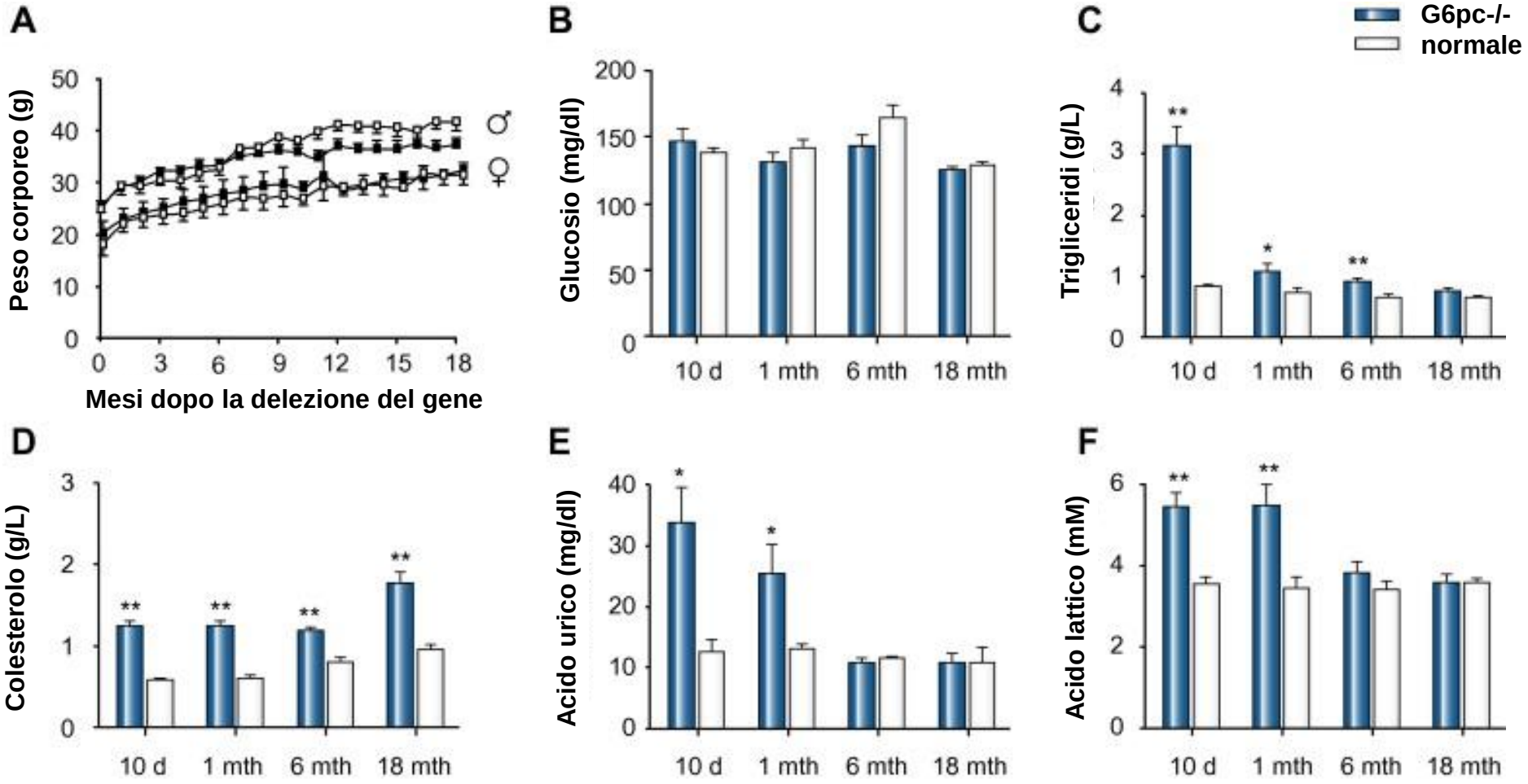
- **A 10 giorni dall'inattivazione il topo manifesta:**
- **Valori ematici alterati di trigliceridi, colesterolo, acido urico.**
- **Ipoglicemia (solo da digiuno).**
- **Accumulo di glucosio-6-fosfato, glicogeno e lipidi a livello epatico.**

- **Col tempo:**
- **I valori ematici tendono a normalizzarsi dopo un mese dall'inattivazione.**
- **Le alterazioni a livello epatico non migliorano col tempo o tendono a peggiorare.**
- **Sviluppo di adenomi multipli a 18 mesi di vita.**

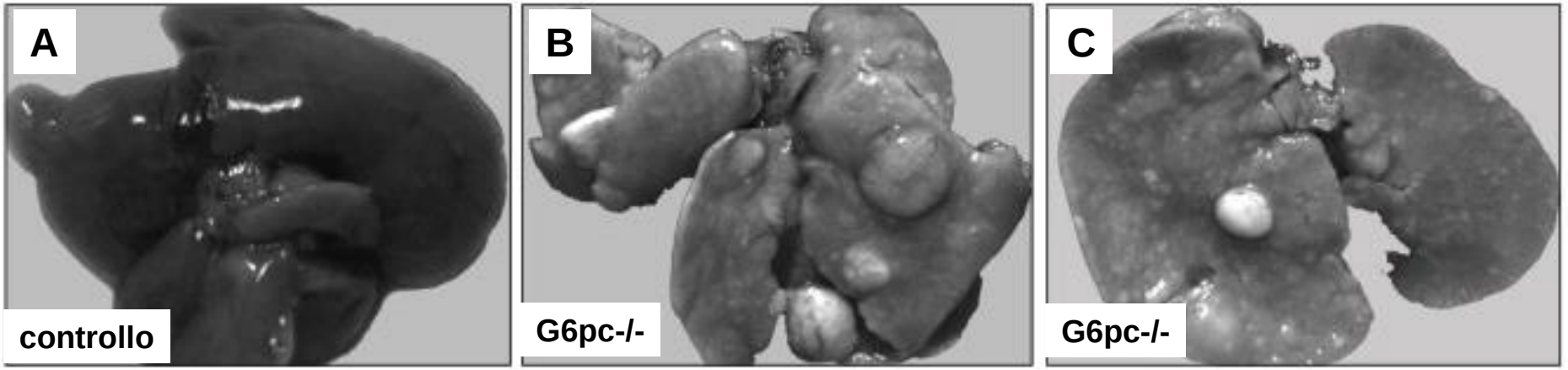
VALORI EPATICI



VALORI EMATICI



18 mesi : Sviluppo di adenomi multipli



CONCLUSIONI

Questi topi hanno tutti i sintomi epatici della patologia umana: epatomegalia, steatosi e accumulo di glicogeno. Hanno inoltre valori ematici alterarti di trigliceridi, colesterolo acido lattico e acido urico.

Mentre alcuni parametri tendono a peggiorare col tempo, altri progressivamente tendono a migliorare. Questo suggerisce che ci siano dei meccanismi compensatori che nel tempo riescono a correggere alcuni dei problemi indotti dalla carenza di G6Pasi nel fegato.

Lo sviluppo di adenomi, alcuni dei quali con caratteristiche pre-carcinomatose, avviene nei fegati affetti da GSD1a.
Vari trattamenti sono in corso di studio per prevenire la comparsa di adenomi.

Modelli animali murini

Modello Murino	Similarità con patologia umana	Praticità del modello	Approccio terapeutico	Costo
KO **J.Y. Chou** **Mutazione in tutti gli organi alla nascita**	**Molto buona.** Eliminazione della G6Pasi da tutti gli organi.	**Difficoltà di gestione** **(**alta mortalità, pochi topi trattabili).	**Virale e cellulare.** Difficoltà di intervento su tutti gli organi interessati**.**	**Medio/alto**
KO condizionale **J.Y. Chou e L. Varesio** **La mutazione della G6pasi viene indotta in utero e solo nel fegato.**	**Parziale.** Solo il fegato è interessato.	**Molto buona** **(**animali vitali e fecondi).	**In corso di studio.** Limitato al fegato**.**	**Medio/basso**
KO condizionale inducibile **G. Mithieux e F. Rajas** **La mutazione della G6pasi viene indotta dopo la nascita e solo nel fegato**	**Modesta.** Solo il fegato è interessato ma dalle 6 settimane di vita in poi.	**Molto buona** (animali vitali e fecondi).	**In corso di studio.** Limitato al fegato	**Medio/basso**

David A. Weinstein, M.D, M.M.Sc.

The GSD dogs

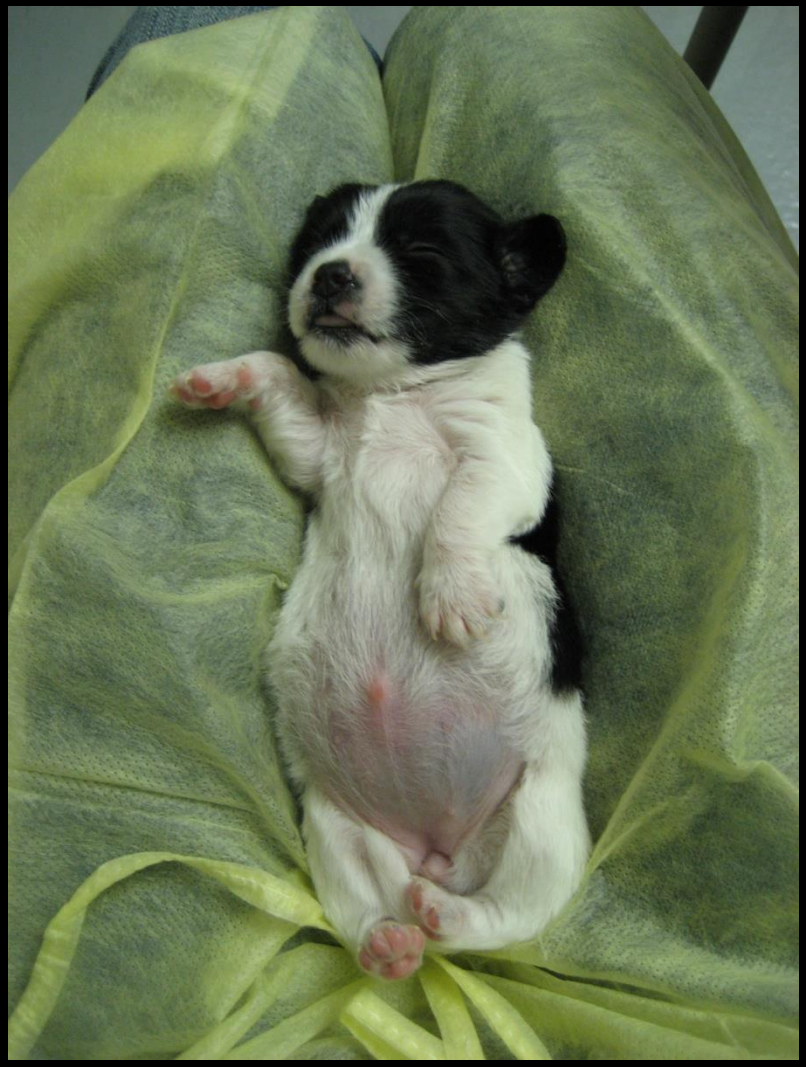
- Naturally occurring in maltese
- Mutation 1 codon away from human mutation
- Associated with no enzyme activity
- Clinically identical to humans
- Prior to study, no dog had survived more than 4 weeks

UF UNIVERSITY of FLORIDA

Cane knock-out

Mutazione spontanea in cani Beagle-Maltesi

- **Il modello canino presenta manifestazioni cliniche molto simili a quelle umane incluso acidosi lattica dai primi giorni di vita.**
- **E' un modello molto difficile. Trattamento orale con glucosio ogni ora.**
- **La terapia nutrizionale può mantenere il cane vivo fino a 5mesi e mezzo, ma acidosi cronica, fatica respiratoria e ipoglicemia intermittente rimangono problematiche,.**
- **I cani affetti da GSD1a continuano ad avere problemi di ipoglicemia da digiuno anche dopo lo svezzamento.**
- **Fino al 50% dei cani con GSD1a nascono morti o muoiono in utero (1 cane GSD1a/anno).**



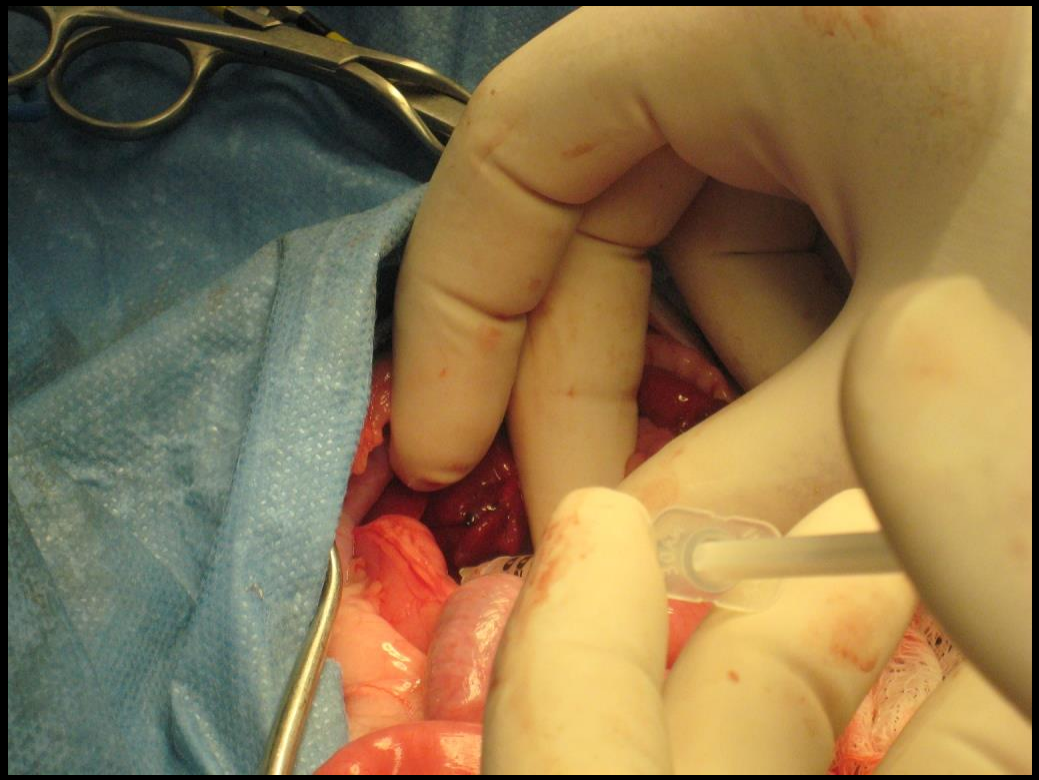
Untreated GSDIa affected dog

- 18 days old

Treated GSDIa affected dog

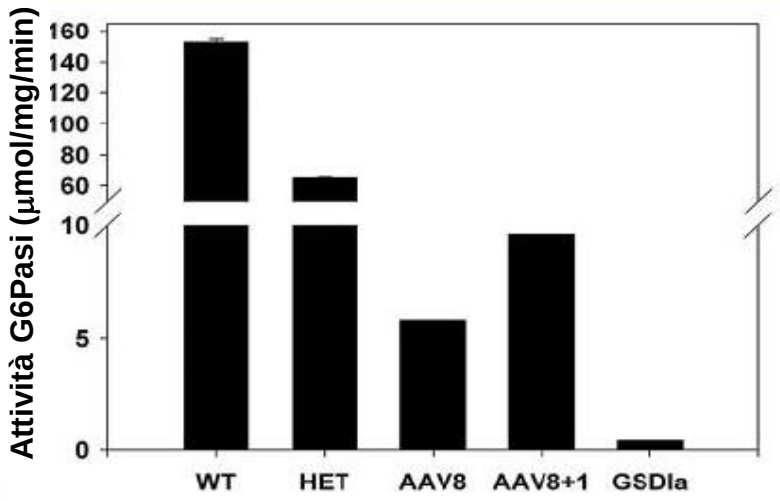
- 17 days old
- 16 days post AAV8 treatment

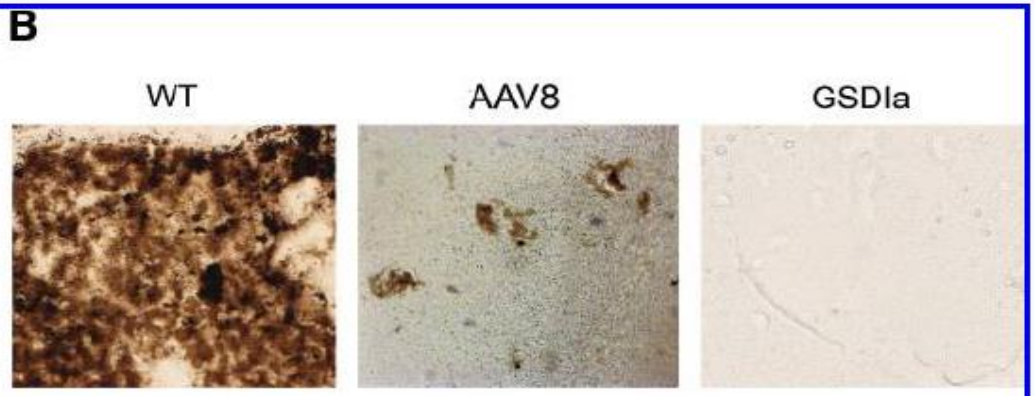
Second Gene Therapy Treatment at 4-1/2 months of age



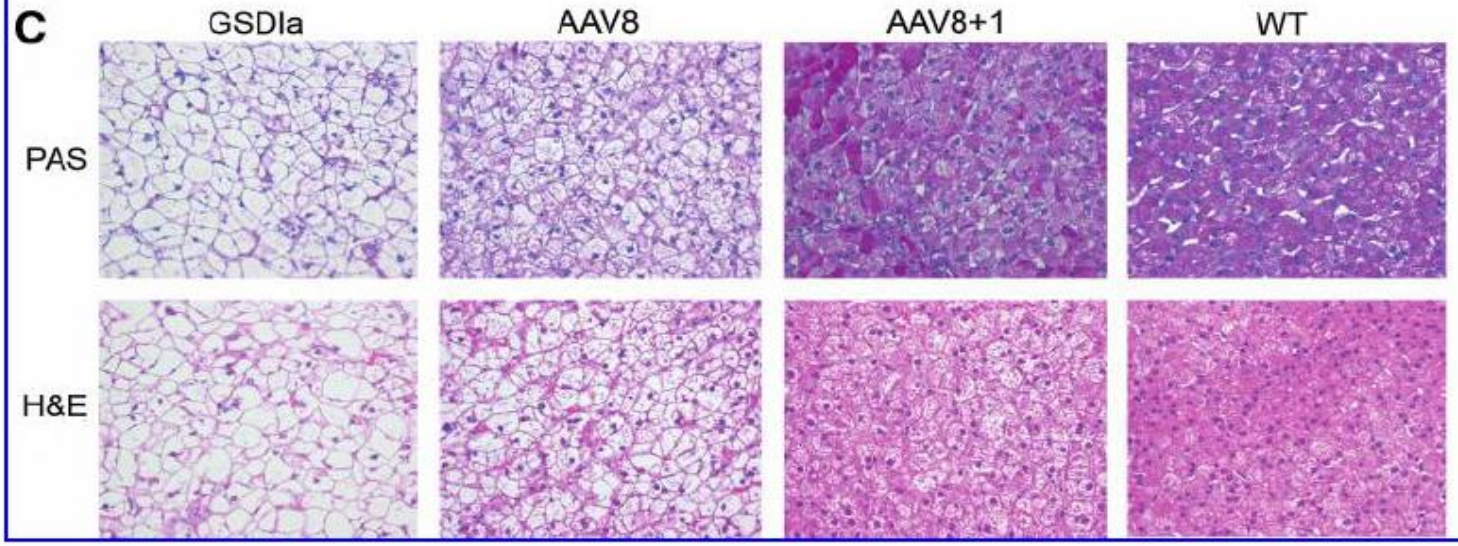
- 1 x 10^{12} viral genomes/kg injected into the hepatic portal vein using AAV-1 as the vector

TRATTAMENTO CON ADENO-ASSOCIATO.





Analisi istochimica di attività G6Pasi



AAV8: 5 mesi
AAV8 +1 :11 mesi

CONCLUSIONI

Un trattamento con adeno-associato :

Risultati ottenuti:
A 8 settimane dall'inoculo gli animali trattati non erano più in grado di mantenere un livello di glicemia normale dopo 2 ore di digiuno.

Due trattamenti con adeno-associato:
uno a un giorno di vita e il secondo a 5 mesi di vita.

Risultati ottenuti:
A 11 mesi di età il cane con GSD1a che aveva ricevuto il doppio trattamento con l'adeno-associato era ancora robusto e capace di sopravvivere senza trattamento con glucosio/carboidrati, mantenendo un livello di glicemia normale anche dopo 9 ore di digiuno.
I valori di lattato, invece, aumentano dopo 9 ore di digiuno indicando che il doppio trattamento con adeno-associato induce solo una correzione parziale.
A questa età il valore di attività G6Pasi era del 6.3% di quella dei cani normali con un miglioramento della struttura epatica e della morfologia degli epatociti.

Non si conoscono gli effetti del trattamento sul rene.

Modelli animali: il modello murino e il modello canino a confronto

	Modello murino KO **Mutazione indotta**	**Modello canino** **Mutazione spontanea**
Similarità con patologia umana	**Molto buona, però non sviluppano acidosi lattica fino ai 6 settimane di vita e comunque la differenza della concentrazione ematica di lattato tra I topi normali e quelli malati è bassa.**	**Molto buona. Presentano la maggioranza delle caratteristiche della GSD1a umana, inclusa una forte acidosi lattica.**
Caratteristiche degli animali	**Ogni femmina può produrre dai 6 agli 8 animali malati all'anno. Alta mortalità degli animali non trattati, ma la terapia dietetica permette la sopravvivenza fino ai 6 mesi di vita.** **Animali di piccola taglia più difficili da trattare e manipolare. I topi hanno una vita breve e quindi possono non sviluppare le problematiche a lungo termine della GSD1a**	**Ogni femmina può produrre un animale malato all'anno. Altissima mortalità degli animali non trattati. Terapia dietetica per i cani non è ottimizzata e permette la sopravvivenza solo fino ai 5 mesi di vita.** **Animali di taglia grossa, facilmente trattabili e manipolabili. Trovando una buona terapia dietetica per mantenerli in vita potrebbero sviluppare le problematiche a lungo termine della GSD1a.**
Valutazione della terapia sperimentale.	**Risultati valutabili statisticamente.** **Variabilità data dal ceppo usato.**	**Trattamento personalizzato visto il bassissimo numero di animali utilizzabili.**
Costo	**Medio alto.**	**Altissimo. Alimentazione ogni 30-60 minuti. Veterinario reperibile 24 ore al giorno.**

CONSIDERAZIONI

I modelli animali sono indispensabili per capire la GSD1a, per sviluppare nuove terapie e per monitorare le complicazioni a lungo termine.

Ulteriori studi sono necessari per ottenere:
- **vettori virali più efficienti (espressione,stabilità e diffusione)**
- **terapie cellulari con effetti più duraturi**

Sia il trasferimento genico che la terapia cellulare potranno essere applicate all'uomo.

Qual è il modello animale migliore?

Entrambi i modelli sono necessari.

Infatti problematiche come:

- **l'impossibilità di valutare alcune manifestazioni cliniche e la difficoltà di valutare**
- **la sicurezza o l'efficacia a lungo termine di un trattamento nel modello murino di**
- **GSD1a**
- **l'impossibilità di trattare molti animali contemporaneamente per una valutazione**
- **statistica e gli altissimi costi del modello canino**

dimostrano la necessità di utilizzare vari modelli animali per gli studi di terapie alternative

Gaslini Institute, Genova, Italy

- **R. Resaz**
- R. Lavieri
- A. Eva
- C.Vanni
- D. Segalerba
- L. Varesio

IST, Genova, Italy

- O. Barbieri

University of Torino

- F. Altruda

Associazione Italiana Glicogenosi

National Institutes of Health, (USA)

- J. Chou

GENE THERAPY MODELS FOR GSD 1 TREATMENT

Animal model	Vector	Results	
G6Pase-/- mouse	Ad-mG6Pase	G6Pase expression in liver Survival: up to 3 months	Zingone, A. et al. 1999
G6Pase-/- mouse	Ad- and AAV-mG6Pase serotype 2/ one injection	G6Pase expression in liver and kidney Survival: up to 12 months	Sun, M-S., et al, 2002
G6Pase-/- mouse	Ad- and AAV-mG6Pase serotype 1/ two injections	Expression in liver and kidney Survival: up to 13 months	Ghosh, A. et al. 2006
G6Pase-/- mouse	AAV-hG6Pase serotype 8 / two injections	Expression in liver Survival: up to 6 months	Koeberl D.D., et al. 2008
G6Pase-/- mouse	AAV-hG6Pase serotype 8 (hG6PC promoter/enhancer)	Complete normalization of hepatic G6Pase-a deficiency. G6Pase expression in liver No fasting hypoglycemia.	Yiu W.H., et al. 2010
G6Pase-/- mouse	Feline immunodeficiency virus–based vector	G6Pase expression in liver Survival: up to 6 months	Grinshpun, A., et al. 2010
G6Pase-/- dog	AAV-canineG6Pase serotype 2	Sustained G6Pase expression Survival: up to 11 weeks	Beaty, R.M., et al. 2002
G6Pase-/- dog	AAV-hG6Pase serotype 8 / two injections	Expression in liver Survival: up to 6 months	Koeberl D.D., et al. 2008
G6Pase-/- dog	AAV-G6Pase serotype 8 + 1 two injections	No fasting hypoglycemia. Survival: up to 23 months	Weinstein, D.A., et al. 201