3° COMUNICAZIONE ORALE

ID: 36 - Sviluppo di una nuova piccola molecola indirizzata a ripristinare l'attività della β-galattosidasi mutatanella GM1-gangliosidosi

Eleonora Pavan1, Maximiliano Ormazabal1, Emma Cuttini1, Roger Marti2, Maurizio Scarpa1, Christine Serratrice3, Vincent Mutel4, AndreaDardis1
1 Centro di coordinamento regionale per le malattie rare, Azienda Sanitaria Universitaria del Friuli Centrale, Udine, Italia., **2** Institute ChemTech,Haute école d'ingénierie et d'architecture de Fribourg, Fribourg, Switzerland., **3** Department of internal medicine of the Aged, UniversityHospital of Geneva, Switzerland., **4** Dorphan Sa, Epalinges, Switzerland.

Background
La GM1-gangliosidosi (GM1) è una malattia d'accumulo lisosomiale per la quale non esiste terapia. È dovuta alla carente attività enzimatica della β-galattosidasi (β-gal), a causa di varianti patogenetiche bialleliche nel gene *GLB1*.Recentemente, l'aloxistatina, un inibitore della cisteina proteasi, ha mostrato un effetto sull'attività della β-gal in vitro: sulla base di questi risultati, abbiamo sviluppato e testato 6 composti ottimizzati da essa derivati.
Metodi
Una tecnica computazionale di ottimizzazione multidimensionale è stata impiegata per la progettazione delle molecole migliorate, tra le quali 6 composti sono stati selezionati e testati per le proprietà ADME/PK e per la loro capacità di aumentare l'attività della β-gal in fibroblasti GM1. La tecnica CRISPR/Cas e la trasfezione transiente sono state sfruttate per sviluppare un sistema in vitro per testare i composti.
Risultati
Il composto #73 è stato selezionato in quanto ha mostrato il miglior profilo ADME/PK complessivo e un aumento dell'attività della β-gal in fibroblasti P1 (p.R201H/p.W576*) di 3 e 0,7 volte rispetto alle cellule non trattate e trattate con aloxistatina, rispettivamente. Nessun effetto è stato osservato in P2 (p.T82M/p.Y199C), confermando la diversasuscettibilità delle varianti *GLB1* ai composti, già nota per l'aloxistatina. Sulla base di queste osservazioni, il composto#73 è stato testato su altre 4 linee di fibroblasti GM1 (P3: p.T82M/p.R419W; P4: p.R201H/p.P549L; P5:p.G123R/p.R201C; P6: p.L422R/p.L422R) mostrandosi efficace solo su P4 e P5.
Al fine di studiare la suscettibilità di diverse varianti di *GLB1*, abbiamo sviluppato e validato un sistema in vitro; nello specifico, abbiamo: 1) generato una linea *GLB1* KO e un set di plasmidi contenenti il cDNA di *GLB1* wild-type o con le varianti presenti nei fibroblasti GM1 testati; 2) trasfettato ciascun plasmide nelle cellule KO; 3) trattato le cellule trasfettate con il composto #73 e misurato l'attività della β-gal: solo le cellule trasfettate con R201H o R201C hanno risposto al trattamento, mostrando un aumento di attività simile a quello osservato in P1, P4 e P5.
Conclusione
Attraverso un'ottimizzazione in silico dell'aloxistatina abbiamo sintetizzato una piccola molecola con un miglior profilo di distribuzione e un'efficacia superiore nel ripristinare l'attività della β-gal mutata. Inoltre, abbiamo sviluppato un sistema in vitro per studiare la suscettibilità delle diverse varianti di *GLB1* al trattamento.