

**Il lungo viaggio scientifico del sirolimus (rapamicina):
dal suolo dell'Isola di Pasqua (Rapa Nui)
alle sperimentazioni condotte presso il Centro “Chiara Gemmo ed Elio
Zago” per la Ricerca sulla β -talassemia (Università di Ferrara)**

Roberto Gambari, Cristina Zuccato, Alessia Finotti

Centro “Chiara Gemmo ed Elio Zago” per la Ricerca sulla Talassemia,
Università di Ferrara

1. Perché indurre emoglobina fetale (HbF) in pazienti con β -talassemia

Le β -talassemie sono tra le emoglobinopatie ereditarie più comuni al mondo, e sono dovute a mutazioni autosomiche nel gene che codifica per la β -globina, causando un'assenza o una bassa sintesi di questa proteina nelle cellule eritropoietiche [1]. I fenotipi vanno da quelli asintomatici (portatore β -talassemico), all'anemia clinicamente rilevante che è classificata come β -talassemia trasfusione-dipendente (TDT, inclusa la talassemia major) e β -talassemia non trasfusione-dipendente (NTDT, talassemia intermedia).

È ampiamente riconosciuto che un'elevata produzione di emoglobina fetale (HbF) in età adulta determina un miglioramento del quadro clinico in pazienti con β -talassemia [2]. Le prime osservazioni cliniche che suggeriscono l'importante ruolo dell'HbF provengono da pazienti con forme rare di β -talassemia, in particolare quelli con ampie delezioni responsabili della $\delta\beta^0$ -talassemia o persistenza ereditaria dell'emoglobina fetale (HPFH), con assenza di produzione di β -globina associata ad un'elevata quantità di produzione di catene γ -globiniche e conseguenti alti livelli di HbF, che determinano un decorso clinico relativamente

benigno. Studi clinici recenti hanno dimostrato che la produzione più elevata di HbF in soggetti con fenotipo HPFH migliora il decorso clinico in una grande varietà di pazienti con β -talassemia.

In questo articolo, presenteremo la storia della rapamicina (sirolimus), dalla sua scoperta alla sua validazione, e all'attività dei ricercatori del Centro "Chiara Gemmo ed Elio Zago" per la Ricerca sulla Talassemia, finalizzata a caratterizzare la rapamicina come induttore di HbF e verificarne l'impiego in studi clinici pilota su pazienti con β -talassemia.

2. Dalla spedizione METEI alla scoperta della rapamicina

L'affascinante storia della scoperta della rapamicina è iniziata durante la spedizione canadese METEI (Medical Expedition to Easter Island) all'Isola di Pasqua (Rapa Nui). La spedizione METEI era composta da un team di circa 40 medici e scienziati [3-5] che si imbarcarono nel novembre del 1964 ad Halifax, Nuova Scozia. Essi erano diretti all'Isola di Pasqua, che nelle carte geografiche è rappresentata da un puntino a forma di triangolo nel Pacifico meridionale, situato a più di 2000 km dal più vicino centro abitato.

La spedizione aveva diversi obiettivi e attività, sia scientifiche che metodologiche e infrastrutturali: un'indagine medica integrata per l'identificazione e la valutazione del ruolo dei fattori ambientali ed ereditari in una popolazione isolata, come la popolazione nativa dell'isola di Pasqua. Sono stati condotti studi su fattori ecologici, sociologici, antropologici, genetici, microbiologici ed epidemiologici, insieme allo sviluppo di metodi di procedure di campionamento, raccolta e trasporto di sangue e altro materiale biologico. Un altro obiettivo importante era anche quello di realizzare un centro sull'isola di Pasqua per l'assistenza sanitaria della popolazione, fornendo infrastrutture e strutture per studi di follow-up.

L'Isola di Pasqua era apparsa agli organizzatori (tra i quali il Dr. Stanley C. Skoryna, Direttore del Laboratorio di Ricerca Gastro-Intestinale e professore associato alla McGill

University, Montreal) un ottimo sito per raggiungere gli obiettivi del METEI, poiché Rapa Nui, come è noto, si trova nel sud-est del Pacifico a 2300 miglia (3700 km) al largo della costa del Cile ed è l'isola abitata più isolata del mondo, con una popolazione indigena (nel dicembre 1964) di 949 abitanti. L'unico contatto esterno regolare degli isolani con la terraferma era una nave di rifornimento annuale. Un ulteriore obiettivo era identificare e purificare nuovi agenti antimicrobici. In particolare, i microbiologi della spedizione erano profondamente interessati a capire perché la popolazione indigena dell'Isola di Pasqua, nonostante andasse in giro a piedi nudi, non si ammalasse di tetano.

Ulteriori informazioni sulla spedizione METEI possono essere trovate nell'articolo di James A. Boutilier (Rapa Nui Journal 1992) [4] e in un libro recentemente pubblicato da Jacalyn Duffin (Stanley's Dream: The Medical Expedition to Easter Island) [5]. La descrizione della scoperta della rapamicina e delle sue applicazioni in biomedicina (includendo anche gli studi pre-clinici e clinici sulla talassemia) è riportata in dettaglio nell'articolo "The Long Scientific Journey of Sirolimus (Rapamycin): From the Soil of Easter Island (Rapa Nui) to Applied Research and Clinical Trials on β -Thalassemia and Other Hemoglobinopathies" [6].

Durante la spedizione del 1964, il microbiologo Georges N6gr6dy raccolse campioni di suolo da diverse parti dell'isola per vedere se poteva riportare materiale utile per identificare gli agenti antimicrobici responsabili della resistenza degli abitanti dell'isola di Pasqua al tetano [5,6]. Nei campioni che aveva raccolto non furono trovate spore di tetano come ci si aspettava. Tuttavia, invece di buttare il terreno, i campioni furono dati agli scienziati che studiavano i composti medicinali prodotti dai batteri, presso Ayerst Pharmaceuticals [6]. All'interno di un campione di suolo ottenuto dalla spedizione METEI nell'Isola di Pasqua, fu identificato un microrganismo produttore di antibiotici: lo *Streptomyces hygroscopicus*. Il principio attivo (un macrolide lipofilo) fu estratto con

solvente organico dal micelio, isolato in forma cristallina e denominato rapamicina. In studi successivi, la rapamicina risultò attiva contro *Candida albicans*, *Microsporium gypseum* e *Trichophyton granulosum*. Il programma terapeutico per lo sviluppo del National Cancer Institute (NCI) dimostrò inoltre che la rapamicina era in grado di inibire la proliferazione cellulare in linee cellulari tumorali. Queste osservazioni hanno incrementato gli studi per capire meglio il meccanismo alla base dell'attività antitumorale. Questi studi, insieme ad altri che hanno evidenziato le bioattività della rapamicina, hanno aumentato l'interesse anche economico nei confronti di questo composto e reso possibile la ricerca biomedica in un importante campo di indagine.

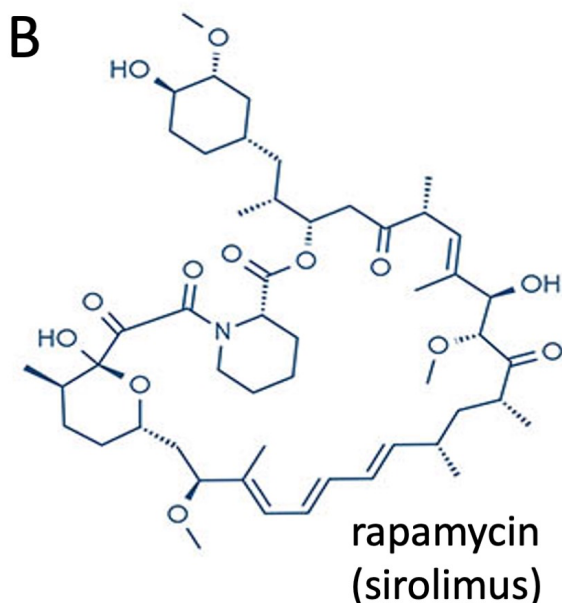


Figura 1. Struttura del sirolimus (rapamicina) isolata da campioni di suolo dell'Isola di Pasqua (Credit: Shutterstock) [13] (<https://www.shutterstock.com/it/search/rapa-nui>: immagini non protette da copyright (Dicembre 2022)).

3. La Rapamicina: applicazioni biomediche

Il meccanismo d'azione della rapamicina (**Figura 1** per la struttura chimica) prevede l'interazione con il recettore citoplasmatico FK506-binding protein-12 (FKBP12); questa interazione genera un complesso FKBP12-rapamicina che si lega e inibisce l'attivazione di mTOR [6] che è una proteina che regola numerosi processi biologici, tra i quali la proliferazione e la motilità cellulare. L'inibizione di mTOR porta alla soppressione della proliferazione delle cellule T, e l'inibizione della progressione delle cellule dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare.

Gli inibitori di mTOR sono utilizzati come agenti immunomodulatori, in particolare nell'ambito della prevenzione del rigetto del trapianto; va inoltre sottolineato che mTOR è un modulatore centrale delle risposte cellulari ai cambiamenti ambientali, ai nutrienti e allo stato dell'ossigeno ed è stato implicato nella regolazione della crescita cellulare, traduzione, autofagia, riarrangiamenti citoscheletrici e sopravvivenza cellulare.

La disregolazione della via mTOR è implicata in numerose malattie (in particolare nei disordini neoplastici). Pertanto, gli inibitori di mTOR (come il sirolimus e tutti gli analoghi strutturali della rapamicina), mostrano una serie di effetti utili dal punto di vista clinico. Ad esempio, il sirolimus e molti tra gli analoghi della rapamicina sono stati impiegati per il trattamento del trapianto di rene, cuore e fegato, per il trattamento del lupus eritematoso sistemico (LES), della linfangioleiomiomatosi (LAM), della sclerosi tuberosa complessa, del meningioma ricorrente, di tumori neuroendocrini pancreatici, di tumori tiroidei, del carcinoma mammario avanzato, di linfomi a cellule B, del carcinoma metastatico del rene [6].

Inoltre, la rapamicina mostra effetti interessanti sulla longevità. I primi dati che suggeriscono che la rapamicina potrebbe influenzare la longevità provengono da studi con

invertebrati. E' stato ad esempio dimostrato che mutazioni di TOR aumentavano la durata della vita di *Caenorhabditis elegans*. Inoltre, è stato dimostrato che mutazioni di TOR aumentavano la durata della vita della *Drosophila*. Sulla base di queste evidenze sperimentali, è stato proposto un programma di ricerca per studiare l'effetto della somministrazione di rapamicina ai topi. I primi dati di questo studio hanno dimostrato che la somministrazione di rapamicina era efficace nell'aumentare la durata della vita dei topi. A partire dai primi studi del 2009, ne sono stati condotti ulteriori approfondimenti che hanno confermato che la rapamicina aumenta la durata della vita dei topi maschi e femmine. L'effetto della rapamicina sulla durata della vita va considerato anche perché è stato replicato in molti laboratori da parte di diversi gruppi di ricerca, utilizzando diversi ceppi di topi da laboratorio trattati con e con diversi regimi di dosaggio della rapamicina [6].

Infine, occorre ricordare che molti studi hanno dimostrato che inibitori di mTOR sono in grado di migliorare le risposte ai vaccini, specialmente negli anziani. Ad esempio, è stato segnalato un impatto del trattamento con rapamicina sull'efficacia del vaccino antinfluenzale. I risultati in questo campo della ricerca preclinica dimostrano che gli inibitori di mTOR e altri farmaci geroprotettivi potrebbe essere considerati per migliorare la capacità di affrontare le malattie che caratterizzano la popolazione anziana [6]. In generale, gli studi effettuati hanno concordemente dimostrato che gli inibitori di mTOR potrebbero svolgere un ruolo importante nel potenziamento della vaccinazione delle persone anziane e fragili, nonché della funzione delle cellule T memoria in generale [6].

4. Breve storia del Centro “Chiara Gemmo ed Elio Zago” per la Ricerca sulla β -thalassemia.

Due iniziative hanno rappresentato la base per la costituzione del Centro “Chiara Gemmo ed Elio Zago per la Ricerca sulla β -thalassemia.

La prima iniziativa è la costituzione e l'attività del "Thal-Lab" (Laboratorio di ricerca sulla terapia farmacologica e farmacogenomica della talassemia), grazie all'instancabile attività di Elio Zago, allora presidente dell'Associazione Veneta per la Lotta alla Talassemia (AVLT, Rovigo). Il Thal-Lab nasce il 1° luglio 2000 a seguito di un Accordo di Collaborazione tra il Centro di Biotecnologie dell'Università di Ferrara (CBF) e l'AVLT. Gli obiettivi erano molteplici: dare respiro internazionale alla ricerca mediante collaborazioni tra centri di ricerca di vari Paesi, tutelare i risultati della ricerca con brevetti internazionali, cercare l'interesse dell'industria farmaceutica per lo sviluppo dei prodotti del Laboratorio (<https://www.avlt.it/thal-lab/>). Per quanto riguarda il primo punto le collaborazioni più fruttuose sono state quella con Eitan Fibach (Hebrew University, Hadassah School of Medicine di Gerusalemme, Israele) e quella con il Prof. Stefano Rivella (Laboratorio di ricerca sulla terapia genica della talassemia della Cornell University, New York. U.S.A.) Queste collaborazioni sono state decisive per la formulazione, presentazione e conduzione del progetto europeo THALAMOSS (THALAssaemia MODular Stratification System for personalized therapy of β -thalassemia). Questo progetto europeo aveva come obiettivo principale lo sviluppo di set universali di marcatori e tecniche per la stratificazione dei pazienti con β -talassemia in sottogruppi di trattamento per (a) insorgenza e frequenza delle trasfusioni di sangue, (b) scelta dei protocolli per la chelazione del ferro, (c) induzione dell'emoglobina fetale (HbF), (d) efficacia di nuovi protocolli di della terapia genica. Al momento della proposta e dell'attuazione del Progetto THALAMOSS non esisteva un quadro affidabile che potesse guidare le decisioni terapeutiche e il trattamento personalizzato della β -talassemia.

L'impatto di THALAMOSS era costituito dalla fornitura di nuovi biomarcatori per distinti sottogruppi di trattamento nella β -talassemia, identificati mediante analisi combinate di genomica, proteomica, trascrittomica e colture tissutali, e la creazione di tecniche di routine per il rilevamento di questi marcatori. Gli strumenti e le tecnologie sviluppate da

ricercatori del progetto THALAMOSS avrebbero facilitato l'identificazione di nuovi test diagnostici, farmaci e trattamenti specifici per sottogruppi di pazienti, e avrebbero guidato approcci terapeutici per la β -talassemia, compresi trattamenti medici personalizzati.

I principali ricercatori di THALAMOSS sono stati R.Gambari (Università di Ferrara, Italia), M. Kleanthous (The Cyprus Foundation for Muscular Dystrophy Research, Cipro), S.Philipsen (Erasmus Universitair Medisch Centrum Rotterdam, Paesi Bassi), E.Katsantoni (Ricerca biomedica Foundation, Accademia di Atene, Grecia), S.Rivella (Cornell University, NY, e The Children's Hospital of Philadelphia, USA), P.Holub (Masaryk University, Repubblica Ceca), P. Moi (Università di Cagliari), S. Menzel e SL.Thein (King's College Hospital, Regno Unito), E.Voskaridou (Laiko General Hospital, Grecia). Le piccole/media imprese (PMI) partecipanti sono state Biocep (Israele), NovaMechanics Ltd. (Cipro) e IRBM (Italia). Attività industriali sono state fornite anche da Harbour Antibodies (Paesi Bassi).

Durante la partecipazione al progetto THALAMOSS, L'attività del Thal-Lab si è avvalsa della fruttifera collaborazione con ricercatori clinici. tra i quali la Dott.ssa Maria Rita Gamberini (Unità Operativa Interdipartimentale di Day Hospital della Talassemia e delle Emoglobinopatie, Arcispedale S. Anna di Ferrara), il Dott. Francesco Chiavilli (Department of Transfusional Medicine - ULSS 18, Rovigo), il Dott. Claudio Favre e il Dott. Francesco Massei (Unità Operativa Oncoematologia Pediatrica, Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana, Pisa), la Dott.ssa Katia Paciaroni e il Dott. Lucarelli (International Centre for Transplantation in Thalassemia and Sickle Cell Anaemia, Mediterranean Institute of Haematology, Policlinic of "Tor Vergata" University, Roma).

I risultati più rilevanti generati da queste collaborazioni è la costituzione di biobanche cellulari, la identificazione del sirolimus come induttore della produzione di HbF e la identificazione di un nuovo bersaglio molecolare per indurre HbF (il repressore LYAR). L'attività del Thal-Lab è stata anche potenziata da unAccordo di Collaborazione stipulato nel gennaio 2004, tra il Centro Di biotecnologie dell'Ateneo di Ferrara e l'AVLT e da due

finanziamenti quinquennali da parte della Fondazione Cassa di Risparmio di Padova e Rovigo (2001-2005 e 2006-2010).

La seconda iniziativa alla base della costituzione del Centro “Chiara Gemmo ed Elio Zago per la Ricerca sulla β -talassemia è nata dalla proposta di dedicare un Laboratorio del Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie alla memoria di Chiara Gemmo (una brillante giovane ricercatrice del Thal-Lab prematuramente scomparsa che aveva passato un periodo di ricerca molto produttivo presso il Laboratorio del Prof. Rivella alla Cornell University, N.Y.). La giovane ricercatrice si trovava in Bolivia, impegnata in un tour in Sudamerica per presentare un suo studio sul sangue.

Nel 2022 si è costituito il Centro “Chiara Gemmo ed Elio Zago” per la Ricerca sulla Talassemia, costituito idealmente dal Thal-Lab e dal Laboratorio intitolato a Chiara Gemmo. I principali sostenitori del Centro sono stati l’Associazione Tutti per Chiara (Presidente Thomas Falamischia) e l’AVLT (Presidente Alberto Cattelan). Le fasi che hanno condotto alla costituzione del Centro sono riassunte in **Figura 2**.

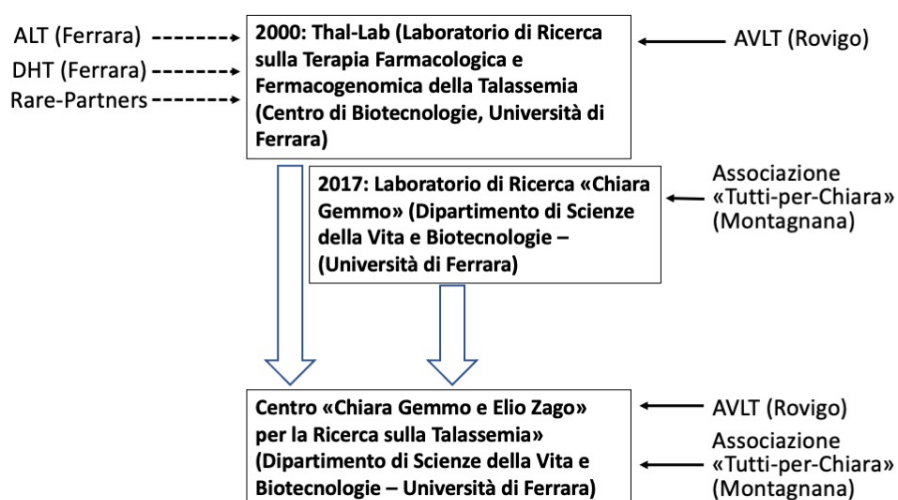


Figura 2. Le fasi e i principali sostenitori che hanno portato alla costituzione del Centro “Chiara Gemmo ed Elio Zago” per la Ricerca sulla Talassemia.

I ricercatori del Centro (Cristina Zuccato, Matteo Zurlo, Lucia Carmela Cosenza, Chiara Papi, Jessica Gasparello, Giulia Breveglieri, Monica Borgatti, Ilaria Lampronti) hanno partecipato attivamente alle ricerche pre-cliniche che hanno permesso l'approvazione di due studi clinici basati sulla rapamicina nella β -talassemia. La **Figura 3** riassume gli studi principali dei ricercatori del Centro (a sinistra) e le attività di sviluppo tecnologico (a destra) che hanno portato all'esecuzione di due studi clinici, NCT03877809 e NCT04247750.

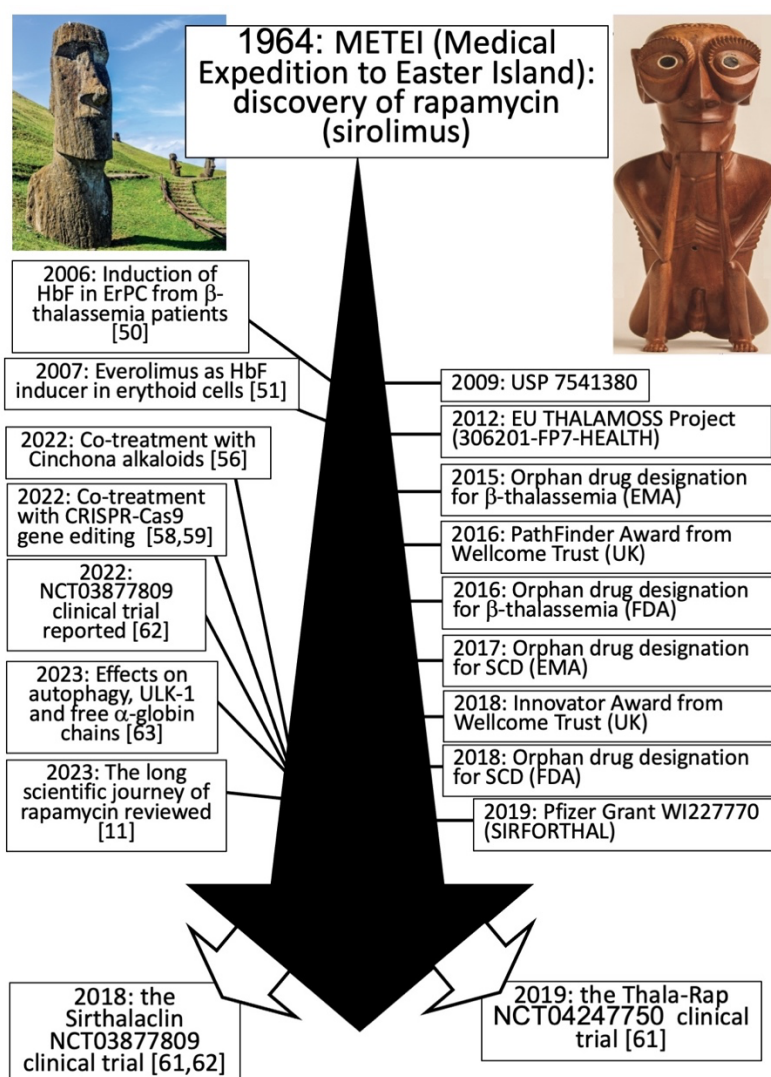


Figura 3. Fasi del viaggio: dalla scoperta del sirolimus, alle ricerche in ambito pre-clinico e alla sperimentazione clinica; fonte dell'immagine in alto a sinistra: Rapa Nui Museum (<https://www.museorapanui.gob.cl/noticias/mahana-o-te-hauhaa-henua>); autore: Tomás Tuki Tepano; permesso alla pubblicazione January 13, 2023.

5. La rapamicina induce la produzione di emoglobina fetale (HbF) in cellule eritroidi.

Un passo importante sulla possibile applicazione della rapamicina nelle malattie ematologiche è stata la dimostrazione che questa molecola è in grado d'indurre il differenziamento eritroide in cellule K562 [7]. Questa linea cellulare, era stata ottenuta più di vent'anni fa da Lozzio e Lozzio dal versamento pleurico di un paziente con leucemia mieloide cronica (LMC) in crisi blastica terminale. Le ragioni per l'utilizzo di questa linea cellulare si basavano sul fatto che la linea cellulare K562 condivide proprietà in comuni con le cellule eritroidi. Le cellule K562 sono state molto utilizzate per lo screening degli induttori di HbF, poichè queste cellule hanno la capacità di differenziare dopo trattamento con varie molecole, producendo grandi quantità di emoglobine, principalmente emoglobine embrionofetali Hb Gower 1 ($\alpha_2\varepsilon_2$), Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$) e in misura minore HbF ($\alpha_2\gamma_2$). Di conseguenza, questa linea cellulare è stata utilizzata in diversi studi per un primo screening di potenziali induttori dell'espressione dei geni per la γ -globina e dell'accumulo di emoglobina fetale.

Per quanto riguarda la gestione clinica dei pazienti beta-talassemici, il sirolimus è stato considerato un farmaco potenzialmente utilizzabile quando è stata dimostrata la prima evidenza della sua capacità di indurre la produzione in vitro di HbF nei precursori eritroidi (ErPC) isolati da pazienti con β -talassemia [8].

L'importanza di questi studi era dovuta al fatto che non era stato approvato alcun trattamento riguardante gli induttori di HbF nella talassemia. Sebbene l'idrossiurea (HU) fosse usata frequentemente (nonostante la mancanza di approvazione formale), il suo uso era limitato dai potenziali effetti avversi e dal fatto che una buona efficacia era stata riportata solo in un sottogruppo di pazienti [2]. Inoltre, alcuni pazienti diventano resistenti all'HU dopo un trattamento a lungo termine. In base a tutte queste considerazioni, la necessità di nuovi induttori di HbF era, ed è tuttora, molto alta [2].

La parte sinistra della **Figura 3** riassume le pubblicazioni più importanti con le quali i ricercatori del “Centro Chiara Gemmo ed Elio Zago” hanno partecipato alla ricerca pre-clinica sull’uso della rapamicina per la β -talassemia [8-15].

6. Protezione della proprietà intellettuale e designazione di farmaco orfano: il contributo di Rare-Partners.

Quando il nostro gruppo ha iniziato a studiare la possibilità di utilizzare la rapamicina per trattare la β -talassemia [8,9], la conoscenza dell'azione del farmaco sulle cellule eritroidi era ancora in gran parte incompleta. D'altra parte, molte ricerche erano già state fatte al fine di identificare agenti in grado di aumentare i livelli di HbF nell'uomo. Sulla base di questi studi il nostro gruppo ha scoperto molti composti, alcuni dei quali di origine naturale, che erano effettivamente in grado di esercitare tale azione in vitro. La rapamicina è stata presto individuata come un prodotto molto interessante, consentendo diverse domande di brevetto. Citando i documenti più rilevanti, la protezione brevettuale è stata concessa da EP1521578B1 e da US2006154950A1. La concessione dei brevetti è stata considerata un passaggio fondamentale di una collaborazione congiunta avviata formalmente nel 2011 e che vedeva coinvolte due associazioni di pazienti (AVLT e ALT), l'Università di Ferrara e la piccola impresa Rare-Partners (RP). Durante questa collaborazione, ci si è resi conto che il riposizionamento per un farmaco (in questo caso rapamicina/sirolimus per la β -talassemia e l'anemia falciforme), uno step importante era ottenere dalle autorità di regolamentazione la designazione di farmaco orfano (ODD). Sulla base dei dati pubblicati dai ricercatori del Centro “Chiara Gemmo ed Elio Zago”, nonché da altri scienziati, Rare Partners ha presentato domanda per ODD per β -talassemia e per anemia falciforme sia in Europa che negli Stati Uniti. Tali riconoscimenti sono stati concessi nel 2015 e nel 2016 per la β -talassemia e nel 2017 e nel 2018 per l'anemia falciforme. Infine, è stato richiesto anche il parere scientifico di EMA per disegnare i trial clinici sulla β -talassemia recentemente

conclusi o in fase di conclusione. Questa attività di “trasferimento tecnologico” è stata riassunta nella parte di destra della **Figura 3**.

7. Inibitori di mTOR e primi studi clinici: risultati degli effetti su pazienti affetti da SCD e β -talassemia

Gli effetti in vivo degli inibitori di mTOR sugli esseri umani sono stati indagati studiando gli effetti sulla produzione di HbF in pazienti trattati con analoghi della rapamicina sottoposti a trapianto di rene. In un primo studio Gaudre et al. riporta il caso di un ricevente di trapianto di rene con SCD che è stato trattato con everolimus [16]. A 10 mesi dall'inizio della terapia, il livello di HbF del paziente era notevolmente aumentato e vi era un'eccellente tolleranza al trattamento. Anche se questo dovrebbe essere considerato uno studio pilota, ha supportato l'ipotesi che gli analoghi della rapamicina potrebbero essere in grado di indurre un aumento della produzione di HbF in vivo [2,8,9]. Più recentemente, Al-Khatti, et al. ha osservato un aumento significativo del livello di HbF dopo il trattamento di pazienti con SCD con sirolimus. Inoltre, si è verificato un ulteriore incremento del livello di HbF quando sirolimus e idrossicarbamide sono stati combinati. Questo è il primo lavoro che documenta un aumento di HbF dopo il trattamento con sirolimus in pazienti con anemia falciforme [17]. Questi studi confermavano e ampliavano gli ottimi risultati ottenuti in sistemi modello murini.

8. Gli studi clinici NCT03877809 e NCT04247750 sulla β -talassemia.

Recentemente sono stati condotti due studi clinici su pazienti con β -talassemia (NCT03877809, “A Personalized Medicine Approach for β -thalassemia Transfusion Dependent Patients: Testing sirolimus in a First Pilot Clinical Trial” e NCT04247750, “Treatment of β -thalassemia Patients with Rapamycin (Sirolimus): From Pre-clinical

Research to a Clinical Trial”). Questi due studi si basano sull'uso di bassi dosaggi di sirolimus (rapamicina) per un periodo di 12 mesi [14].

L'obiettivo principale di questi studi interventistici, pilota, in aperto di fase II con sirolimus in pazienti con β -TDT (talassemia trasfusione-dipendente) era verificare la sua efficacia come induttore di HbF in vivo con l'obiettivo di ridurre la necessità di trasfusioni con una buona tollerabilità. Inoltre, la possibilità di conoscere genotipi e polimorfismi del DNA (compresi i polimorfismi associati all'HbF) dovrebbe portare informazioni importanti per un possibile approccio di medicina personalizzata e di precisione nella β -TDT.

Il primo protocollo (EudraCT n° 2018-001942-33, NCT 03877809) denominato SIRTHACLIN, è stato uno studio monocentrico condotto presso il Centro per la Talassemia dell'Azienda Ospedaliera-Universitaria S. Anna (Ferrara, Italia). In questo caso, i pazienti β -talassemici erano stati reclutati tra pazienti con genotipi β^+/β^+ e β^+/β^0 [14].

Il secondo protocollo (EudraCT n°2018-001469-18, NCT 04247750) denominato THALA-RAP è uno studio multicentrico condotto a Ferrara (Azienda Ospedaliera-Universitaria S. Anna, Ferrara, Italia), Firenze (Azienda Ospedaliera-Universitaria A. Meyer, Firenze, Italia) e Pisa (Azienda Ospedaliera-Universitaria Pisana, Pisa, Italia). In questo caso, i pazienti β -talassemici sono stati reclutati tra pazienti con genotipi β^0/β^0 e β^+/β^0 [14].

9. Rapamicina e applicazioni biomediche in ematologia: il viaggio non è ancora terminato.

I risultati dello studio clinico NCT03877809 basato sul sirolimus [15] dimostrano che l'espressione dell'mRNA della γ -globina aumenta nel sangue e nei precursori eritroidi isolati da pazienti con β -talassemia trattati con sirolimus a basso dosaggio. Questo studio ha anche dimostrato che il sirolimus influenza l'eritropoiesi e riduce i marcatori biochimici associati all'eritropoiesi inefficace (catene α -globiniche libere in eccesso, bilirubina,

recettore solubile della transferrina e ferritina). Sono quindi auspicabili ulteriori studi clinici più ampi, possibilmente includendo la sperimentazione del farmaco in pazienti con forme meno gravi della malattia e lo studio di terapie combinate.

In questo contesto, Zuccato et al. [10] hanno scoperto che il sirolimus agisce in sinergia con gli alcaloidi della Cinchona (cinchonidina e chinidina), con una buona induzione di HbF nei precursori eritroidi isolati da pazienti con β -talassemia. I dati ottenuti indicano in modo evidente che il trattamento combinato dovrebbe essere preso in considerazione in futuri esperimenti, cercando di comprendere le basi molecolari di questi effetti sinergici.

I trattamenti combinati dovrebbero includere anche nuovi approcci genomici, tra cui la terapia genica e l'editing genomico. Ad esempio, Cosenza et al., sono stati recentemente in grado di dimostrare che la produzione de novo di emoglobina adulta (HbA) utilizzando il metodo CRISPR-Cas9 [11] può essere combinato con l'induzione di HbF mediata dalla rapamicina [12,13]. Nel loro studio, l'editing genetico della mutazione β^039 è stato ottenuto utilizzando una strategia sperimentale basata su CRISPR-Cas9; la correzione della sequenza genica e la trascrizione del gene corretto sono state analizzate rispettivamente mediante allele-specifico droplet digital PCR e RT-qPCR; il contenuto relativo di HbA e HbF è stato studiato mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) e Western blotting. Per l'induzione dell'HbF è stata utilizzata la rapamicina. I dati ottenuti dimostrano in modo inequivocabile che in precursori eritroidi isolati da pazienti con β^039 -talassemia la produzione di HbA e HbF si ottiene mediante correzione della mutazione con il sistema del GE e l'induzione da parte della rapamicina [12].

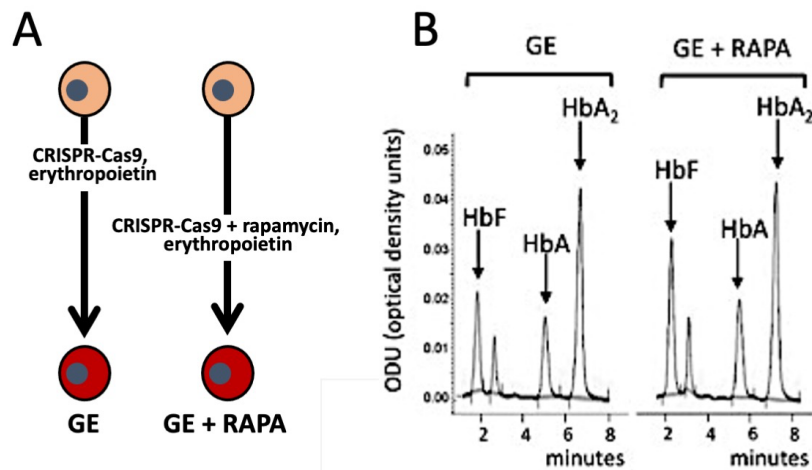


Figure 4. Co-trattamento di ErPC da pazienti β -talassemici con l'approccio basato su CRISPR-Cas9 per correggere la mutazione del β^{039} (GE) e l'induzione dell'emoglobina fetale dopo il trattamento con rapamicina (RAPA). A. Rappresentazione del protocollo sperimentale. B. Dimostrazione che nelle cellule trattate (GE + RAPA) l'HbF è aumentata, insieme alla produzione "de novo" di HbA. Estrapolato da Cosenza et al., con permesso (<https://www.mdpi.com/2073-4425/13/10/1727>) [12].

Inoltre, nel viaggio del sirolimus si dovrebbe valutare la possibilità di verificarne gli effetti su pazienti affetti da anemia falciforme (SCD). Mentre i globuli rossi sono generalmente rotondi e flessibili, nella SCD, alcuni globuli rossi hanno la forma di falci o lune crescenti. Ciò è causato dalla produzione di emoglobina anomala con un'elevata tendenza a precipitare, causando l'irrigidimento e un'elevata viscosità delle cellule falciformi, che possono rallentare o addirittura bloccare il flusso sanguigno. La scoperta della proprietà anti-falciforme dell'HbF è il razionale per proporre il sirolimus come possibile farmaco per la SCD, considerando la sua comprovata capacità di indurre l'HbF [15,17]. Pertanto, il sirolimus dovrebbe essere impiegato negli studi clinici per i pazienti con SCD.

Inoltre, le ricerche eseguite nell'ambito dello studio clinico Sirthalaclin hanno dimostrato che il sirolimus è un potente attivatore dell'autofagia. Questo rende il sirolimus molto interessante per contrastare l'eritropoiesi inefficace dovuta, almeno in parte, dall'accumulo di catene "libere" di α -globina [18].

Un ultimo commento riguarda i polimorfismi del DNA associati all'induzione di HbF. Questo è un punto rilevante che dovrebbe avere un peso importante sui criteri di reclutamento dei pazienti per i trattamenti a base di sirolimus. In questo contesto, quando è stata analizzata la relazione tra rapamicina-induzione di HbF e polimorfismi del DNA, i

polimorfismi rs368698783 LYAR (G>A) e XmnI hanno mostrato un'elevata associazione [19]. Una bassa relazione è stata trovata quando sono stati analizzati MYB rs9399137, BCL11A rs14227407 e BCL11A rs10189857. Sarà necessaria un'analisi più ampia che includa altri polimorfismi associati all'HbF (come KLF1) per determinare qual'è il polimorfismo che mostra la più alta associazione con l'induzione dell'HbF mediata dalla rapamicina.

In conclusione, si prevede che, per il prossimo futuro, l'attività della rapamicina sarà ancora oggetto di intenso studio da parte dei ricercatori del Centro "Chiara Gemmo ed Elio Zago" per la Ricerca sulla β -Thalassemia, sempre in stretta collaborazione con le Associazioni ("Tutti per Chiara", AVL T e ALT) .

Riferimenti bibliografici

1. Weatherall DJ. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Nat Rev Genet.* 2001; 2(4):245-55.
2. Prosdocimi M, Zuccato C, Cosenza LC, Borgatti M, Lampronti I, Finotti A, Gambari R. A Rational Approach to Drug Repositioning in β -thalassemia: Induction of Fetal Hemoglobin by Established Drugs. *Wellcome Open Res.* 2022;7:150.
3. Bethany Halford. Rapamycin's secrets unearthed. *Chemical & Engineering News.* 2016; 94(29).
4. James A. Boutilier. METEI: A Canadian medical expedition to Easter Island, 1964-65. *Rapa Nui Journal* 1992; 6: 21-34.
5. Jacalyn Duffin, *Stanley's Dream: The Medical Expedition to Easter Island*, McGill-Queen's University Press, Quebec.
6. Gambari R, Zuccato C, Cosenza LC, Zurlo M, Gasparello J, Finotti A, Gamberini MR, Prosdocimi M. The Long Scientific Journey of Sirolimus (Rapamycin): From the Soil of

Easter Island (Rapa Nui) to Applied Research and Clinical Trials on β -Thalassemia and Other Hemoglobinopathies. *Biology (Basel)*. 2023 Sep 2;12(9):1202. doi: 10.3390/biology12091202.

7. Mischiati C, Sereni A, Lampronti I, Bianchi N, Borgatti M, Prus E, Fibach E, Gambari R. Rapamycin-mediated induction of gamma-globin mRNA accumulation in human erythroid cells. *Br J Haematol*. 2004 Aug;126(4):612-21. doi: 10.1111/j.1365-2141.2004.05083.x.

8. Fibach E, Bianchi N, Borgatti M, Zuccato C, Finotti A, Lampronti I, Prus E, Mischiati C, Gambari R. Effects of rapamycin on accumulation of alpha-, beta- and gamma-globin mRNAs in erythroid precursor cells from beta-thalassaemia patients. *Eur J Haematol*. 2006;77(5):437-41.

9. Zuccato C, Bianchi N, Borgatti M, Lampronti I, Massei F, Favre C, Gambari R. Everolimus is a potent inducer of erythroid differentiation and gamma-globin gene expression in human erythroid cells. *Acta Haematol*. 2007;117(3):168-76.

10. Zuccato C, Cosenza LC, Zurlo M, Lampronti I, Borgatti M, Scapoli C, Gambari R, Finotti A. Treatment of Erythroid Precursor Cells from β -Thalassemia Patients with Cinchona Alkaloids: Induction of Fetal Hemoglobin Production. *Int J Mol Sci*. 2021;22(24):13433.

11. Cosenza LC, Gasparello J, Romanini N, Zurlo M, Zuccato C, Gambari R, Finotti A. Efficient CRISPR-Cas9-based genome editing of α -globin gene on erythroid cells from homozygous $\alpha^0\beta^+$ -thalassemia patients. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2021;21:507-523.

12. Cosenza LC, Zuccato C, Zurlo M, Gambari R, Finotti A. Co-Treatment of Erythroid Cells from β -Thalassemia Patients with CRISPR-Cas9-Based $\alpha^0\beta^+$ -Globin Gene Editing and Induction of Fetal Hemoglobin. *Genes (Basel)*. 2022;13(10):1727.

13. Finotti A, Gambari R. Combined approaches for increasing fetal hemoglobin (HbF) and de novo production of adult hemoglobin (HbA) in erythroid cells from β -thalassemia patients: treatment with HbF inducers and CRISPR-Cas9 based genome editing. *Front Genome Ed*. 2023 Jul 17;5:1204536. doi: 10.3389/fgged.2023.1204536. eCollection 2023.

14. Gamberini MR, Prosdocimi M, Gambari R. Sirolimus for Treatment of α -Thalassemia: From Pre-Clinical Studies to the Design of Clinical Trials. *Health Education and Public Health* 2021; 4(3): 425 - 435. doi: 10.31488/HEPH.165
15. Zuccato C, Cosenza LC, Zurlo M, Gasparello J, Papi C, D'Aversa E, Breveglieri G, Lampronti I, Finotti A, Borgatti M, Scapoli C, Stievano A, Fortini M, Ramazzotti E, Marchetti N, Prosdocimi M, Gamberini MR, Gambari R. Expression of γ -globin genes in β -thalassemia patients treated with sirolimus: results from a pilot clinical trial (Sirthalaclin). *Ther Adv Hematol*. 2022;13:20406207221100648.
16. Gaudre N, Cougoul P, Bartolucci P, Dörr G, Bura-Riviere A, Kamar N, Del Bello A. Improved Fetal Hemoglobin With mTOR Inhibitor-Based Immunosuppression in a Kidney Transplant Recipient With Sickle Cell Disease. *Am J Transplant*. 2017; 17:2212-2214.
17. Al-Khatti AA, Alkhunaizi AM. Additive effect of sirolimus and hydroxycarbamide on fetal haemoglobin level in kidney transplant patients with sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2019; 185: 959-961.
18. Zurlo, M.; Zuccato, C.; Cosenza, L.C.; Gasparello, J.; Gamberini, M.R.; Stievano, A.; Fortini, M.; Prosdocimi, M.; Finotti, A.; Gambari, R. Decrease in α -Globin and Increase in the Autophagy-Activating Kinase ULK1 mRNA in Erythroid Precursors from β -Thalassemia Patients Treated with Sirolimus. *International Journal of Molecular Sciences*, *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 15049.
19. Zuccato C, Cosenza LC, Zurlo M, Breveglieri G, Bianchi N, Lampronti I, Gasparello J, Scapoli C, Borgatti M, Finotti A, Gambari R. The rs368698783 (G>A) Polymorphism Affecting LYAR Binding to the $A\gamma$ -Globin Gene Is Associated with High Fetal Hemoglobin (HbF) in β -Thalassemia Erythroid Precursor Cells Treated with HbF Inducers. *Int J Mol Sci*. 2023 Jan 1;24(1):776. doi: 10.3390/ijms24010776.

Questo articolo è dedicato alla memoria di Brunello Mazzoli.