

# Perspectives of Wilson's disease treatment

## Perspektywy leczenia choroby Wilsona

Agnieszka Antos, Tomasz Litwin, Marta Skowrońska, Iwona Kurkowska-Jastrzębska, Anna Członkowska

II Klinika Neurologii, Instytut Psychiatrii i Neurologii w Warszawie

### ABSTRACT

**Objectives.** Wilson's disease (WD) is a genetic, neurodegenerative disorder caused by copper metabolism disturbances with subsequent pathological copper accumulation in organs and tissues (mainly liver and brain) with their secondary damage and clinical symptoms related to affected organs. The treatment of the disease is based on medications leading to negative body copper balance, i.e. (1) decreasing absorption of copper from the digestive tract (zinc salts); (2) increasing the copper excretion with urine (chelators: d-penicillamine, trientine, dimercaprol); and (3) liver transplant in specific

clinical situations (acute liver failure, liver cirrhosis decompensation despite treatment). The article aims to review the available literature concerning the current research directions in WD treatment.

**Literature review.** During the space of last years, intensive research into the new treatment of WD has started, including: (1) new pharmacological agents (modified thermostable trientine, trientine with delivery system to central nervous system, molybdenum salts, methanobactin, and others); (2) gene therapy; and (3) cells therapy (hepatocytes transplant). We conducted a targeted literature review of PubMed articles written in English, using the following search terms: "Wilson's disease," "treatment perspectives," and "gene therapy." Reviews, original articles, randomised controlled trials, meta-analyses, book chapters, and abstracts published up to April 2021 were included. Below, we present a narrative synthesis of the extracted data.

**Conclusions.** Currently, chelators, medications decreasing absorption of copper from the digestive tract, and liver transplant are the treatment methods recommended by international societies as a WD treatment. Among the studies on new therapies for WD, the research with tetrathiomolybdate bis-choline is the most advanced and promising. Great hope can be associated with gene therapy.



Received: 26.04.2021

Accepted: 12.07.2021

### KEYWORDS

- Wilson's disease
- trientine
- molybdenum
- gene therapy

### SŁOWA KLUCZOWE

- choroba Wilsona
- trientina
- molibden
- terapia genowa

### CORRESPONDENCE ADDRESS / ADRES DO KORESPONDENCJI

Agnieszka Antos

II Klinika Neurologii, Instytut Psychiatrii i Neurologii

Sobieskiego 9 str., 02-957 Warszawa, Poland

Tel.: (+48) 22 4582874, Fax: (+48) 22 8424023

email: [agantos@ipin.edu.pl](mailto:agantos@ipin.edu.pl)

### STRESZCZENIE

**Cel.** Choroba Wilsona (chW) jest to genetyczna choroba neurozwyrodnieniowa, której przyczyną jest zaburzony metabolizm miedzi z jej następczym patologicznym

odkładaniem się w narządach i tkankach (głównie w wątrobie i mózgu) z ich wtórnym uszkodzeniem oraz objawami klinicznymi związanymi z zajętymi narządami. Leczenie chW opiera się na stosowaniu leków powodujących powstanie w organizmie ujemnego bilansu gospodarki miedzią przez: (1) zmniejszanie wchłaniania miedzi z przewodu pokarmowego (sole cynku), (2) zwiększanie wydalania miedzi z moczem (leki chelatujące jony miedzi: d-penicylamina, trientyna, dimerkaprol) oraz (3) w szczególnych przypadkach (ostra niewydolność wątroby, dekompensacja marskości wątroby mimo leczenia farmakologicznego chW) przeszczep wątroby. Celem pracy jest przegląd aktualnych kierunków badań dotyczących przyszłości leczenia chW.

**Przegląd literatury** W ostatnich latach rozpoczęto intensywne badania nad nowymi metodami leczenia chW, tj. (1) farmakologicznymi (zmodyfikowana termostabilna cząsteczka trientyny, trientyna z systemem wspomagającym penetrację bariery krew-mózg, sole

molibdenu, metanobaktyna i inne), (2) terapią genową oraz (3) terapią komórkową (przeszczepy hepatocytów). Przeprowadzono celowany przegląd literatury, artykułów dostępnych w bazie PubMed w języku angielskim, wyszukując hasła: „choroba Wilsona”, „perspektywy leczenia” i „terapia genowa”. Uwzględniono przeglądy, artykuły oryginalne, randomizowane badania kontrolowane, metaanalizy, rozdziały książek i streszczenia opublikowane do kwietnia 2021 roku. Poniżej przedstawiono podsumowanie zgromadzonych danych.

**Wnioski.** Obecnie leki chelatujące miedź, preparaty zmniejszające wchłanianie miedzi z przewodu pokarmowego oraz przeszczep wątroby to jedyne metody rekomendowane przez międzynarodowe towarzystwa naukowe jako formy terapii chW. Spośród badań nad nowymi metodami leczenia chW najbardziej zaawansowane i obiecujące są badania z tetratiomolibdianem bis-choliny. Dużą nadzieję na leczenie chW w najbliższych latach można wiązać z terapią genową.

## 1. Introduction

Wilson's disease is an autosomal recessive, genetically inherited disease, in the course of which pathological copper accumulation in many organs and tissues (mainly in liver and brain) with their secondary damage occurs. The gene responsible for the development of the disease (*ATP7B*) is located on chromosome 13 (13q14), consists of 21 exons and encodes the P-type ATPase protein (*ATP7B*) (EASL 2012). Expression of this protein is highest in liver, but it is also found in brain, kidneys, and heart, among others. ATPase 7B is a transmembrane enzyme that in hepatocytes mediates the incorporation of copper into apoceruloplasmin, and it is also involved in the excretion of copper into bile through the bile canaliculus. With a pathogenic mutation in the *ATP7B* gene, ATPase function is impaired and copper accumulates excessively in hepatocytes, leading to hepatocyte damage. Then, this element in its "free form," loosely bound to albumin and other small-molecule proteins – non-ceruloplasmin bound copper (NCC) – enters the bloodstream, damaging subsequent organs and causing extrahepatic clinical manifestations of WD (EASL 2012; Członkowska *et al.* 2018). The term NCC was introduced in the 1950s for the diagnosis and treatment monitoring of WD (Roberts & Schilsky 2008; EASL 2012). In healthy subjects, the average serum copper concentration is 1 mg/l (norm: 70–140 µg/dl), of which 65–95% of copper ions are bound to ceruloplasmin, and the remainder mainly to albumins, alpha-2-macroglobulin, amino acids, the so-called small Cu carriers (SCC), and low-molecular-weight ligands (LMW). The latter pool of copper, unbound to

ceruloplasmin, is kinetically labile, less bound to transporters, and thus more easily deposited in tissues; it undergoes chemical reactions more frequently (producing free radicals); it is considered toxic and is referred to by the term free copper (NCC) (Brewer *et al.*, 2009; Falcone *et al.*, 2021). Ironically, in the course of untreated WD, total copper, which is basically a reflection of serum ceruloplasmin concentration, is decreased (secondary to decreased ceruloplasmin concentration), while there is an increase in NCC concentration > 15 µg/dl (norm: 5–15 µg/dl). With proper WD therapy, NCC levels should be within the normal range as in the healthy population.

In diagnostics and treatment of WD, the NCC value is determined indirectly (as a result of calculation based on a mathematical formula that takes into account ceruloplasmin and copper levels in serum) and the result may also be subject to error due to methodological reasons. There is a discrepancy in results between different laboratories, so it is important to get results obtained by the same laboratory for one patient (EASL, 2012). Notwithstanding these uncertainties, NCC concentration is now proposed as one of the potential laboratory endpoints of most drug trials in WD (Roberts & Schilsky, 2008; EASL, 2012; Weiss & Stremmel, 2014; Litwin *et al.* 2019). New methods for NCC determination are being intensively researched (Poujois *et al.* 2017).

Wilson's disease can be effectively treated with copper chelating agents – d-penicillamine (DPA) or trientine dihydrochloride (TN), substances that reduce copper absorption from the gastrointestinal tract – zinc salts (ZS), and in special situations with liver transplant (EASL, 2012; Członkowska *et al.*, 2018). Using currently

available treatments for WD, the prognosis for patients is good in most cases and mortality is similar to the healthy population (Członkowska *et al.*, 2005; Svetel *et al.*, 2009; Bruha *et al.*, 2011; Beinhart *et al.*, 2014; Członkowska *et al.*, 2018). The prerequisites for a good prognosis are primarily as follows: (1) early diagnosis of WD at the stage of potentially reversible organ changes and (2) correct intake of anti-copper drugs (compliance) (EASL, 2012). Approximately, 85% of patients with WD are successful in achieving clinical improvement, stopping disease progression, and preventing the development of clinical symptoms in asymptomatic patients (Schilsky, 2014). Approximately, 15% of patients have an unfavourable prognosis, which is most often related to: (1) medication not being taken as prescribed – up to 26% of patients (Masełbas *et al.*, 2019); (2) adverse effects of anti-copper drugs – up to 30% (EASL, 2012), including early paradoxical worsening of neurological symptoms following treatment with chelating agents – up to 10% of patients (Brewer *et al.*, 1987; Kim *et al.*, 2013; Litwin *et al.*, 2015); and (3) persistence of neurological symptoms despite treatment – up to 50% of patients (Członkowska *et al.*, 2005; Bruha *et al.*, 2011; Weiss & Stremmel, 2014; Litwin *et al.*, 2016; Członkowska & Litwin, 2017; Członkowska *et al.*, 2018). These limitations have prompted the search for new, more effective, safer and more convenient for the patient to use (thermostable, used once a day) drugs and therapies in WD (Litwin *et al.*, 2018). This paper presents the literature review of recent years regarding research on new therapies in WD.

## Literature review

Targeted literature review was conducted, including articles available in the PubMed database in English, searching for the following keywords: “Wilson's disease,” “treatment perspectives,” and “gene therapy.” Reviews, original articles, randomised controlled trials, meta-analyses, book chapters, and abstracts published by April 2021 were included. The following is a summary of the data collected.

## 2. Pharmacological treatment

### 2.1. Trientine (TN, dichloride) used once a day

One of the major challenges in the pharmacotherapy of WD is the appropriate use of medications by patients (Masełbas *et al.*, 2019). Non-adherence is influenced by the need to take traditionally used medications for the treatment of WD three times a day, between meals (EASL, 2012). For this reason, the chelating drug trientine (TN) was suggested to be used one time a day (Ala *et al.*, 2015). Ala *et al.* (2015) conducted a prospective study on eight

patients with stable WD using TN once daily (15 mg/kg of body weight) for 12 months. During follow-up, all patients remained clinically stable and no one was excluded from the study – the criterion for early termination of the study participation was an increase in alanine (AlAT) or aspartate aminotransferase (AspAT) of more than two-fold compared with baseline. Copper metabolism studies also indicated adequate treatment (copper excretion in daily urine collections averaged 313.4 ug/24 hours). On the downside of this evaluation, it should be noted that: (1) the patients had already been treated for WD (stable WD, changes in the copper metabolism, and changes in the clinical picture after the dose reduction may not occur within a year); (2) the study was conducted on a very small group – only eight patients with WD. Further prospective studies are needed, consisting in optimising the daily dosage of the drugs used in WD and their administration regimen to draw further conclusions regarding the feasibility of taking TN once a day in the treatment of WD (Ala *et al.*, 2015).

### 2.2. Trientine derivatives

#### A. Thermostable TN (TN tetrachloride)

The form of TN used since the 1970s, dihydrochloride, is a molecule that is unstable at room temperature and requires refrigerated storage (2–8 degrees Celsius). This makes it difficult for patients to take the drug correctly (e.g. due to work or travel); additionally, the drug is taken 3–4 times a day. The modified drug molecule, TN tetrachloride, is thermostable and can be taken less frequently. In 2017, the Committee for Medicinal Products for Human Use of the European Medicines Agency (EMA) approved this drug formulation (Cuprior) as tablets (150 mg) administered 2–4 times daily for use in patients with WD > 5 years of age. The drug is currently in a clinical trial comparing the efficacy and safety of the drug with the standard treatment for WD – DPA (EudraCT: 2016-003876-29).

#### B. TN transported across the blood-brain barrier in liposomes

TN routinely used in the treatment of BD as an oral copper chelating drug, just as other drugs currently used to treat WD (DPA and ZS), does not penetrate the blood-brain barrier (BBB) (EASL, 2012; Członkowska *et al.*, 2018). Theoretically, drugs potentially passing through the BBB should more effectively remove excess copper from the central nervous system (CNS), leading to more effective treatment of the neurological symptoms of WD. In 2016, researchers from Heidelberg developed a new system for transporting TN dihydrochloride across the BBB (Tremmel *et al.*, 2016). They created capsules from modified liposomes that contained the drug so that they would bind to the surface of the BBB, and tested their penetration through the BBB in rat animal models of

WD. The results were encouraging with high levels of TN found in the brain (Tremmel *et al.*, 2016). These studies are at a preliminary stage and have not yet been tested in experimental models of WD to assess copper removal from the CNS. The idea of a drug passing the BBB is very interesting, but still needs a lot of research to confirm the efficacy and safety of this formulation, for now in animal models.

### 2.3. Molybdenum salts

Historically, tetrathiomolybdate (TTM) as an ammonium salt has been used experimentally in clinical trials in WD since the 1980s (Brewer *et al.*, 2006). It has a dual mechanism of action, i.e. (1) when administered with a meal, it prevents gastrointestinal copper absorption by forming copper complexes with food and TTM that are not absorbed from the gastrointestinal tract; (2) when administered on an empty stomach, it removes copper from hepatocytes (bound to metallothioneins) into the bile, and in the systemic circulation it combines with NCC to form stable molybdenum-copper-albumin complexes (which prevent access of this bound copper to other tissues and prevent the onset of oxidative stress), which are then caught by the liver and excreted into the bile, leading to a negative copper balance in the body (Brewer *et al.*, 2006, Rupp *et al.*, 2019).

Patients with WD taking TTM ammonium salt were less likely to have increased neurological symptoms, compared to the groups using DPA and TN, which was associated with the lack of rapid increase in NCC in serum (Brewer *et al.*, 2006). Despite the promising results, the main difficulties in the use of TTM ammonium salts in the treatment of WD were due to the need for frequent dosing of the drug – six times a day (three times before meals and three times after) and side effects (anaemia, leukopenia, increase in aminotransferases) (Brewer *et al.*, 2006; Brewer *et al.*, 2009; EASL, 2012). This form of the drug has not been registered for the treatment of WD (it has only been used in clinical trials) (Brewer *et al.*, 2006; Brewer *et al.*, 2009).

Mainly due to the difficulties associated with the need to take TTM ammonium salt multiple times per day, a new formulation has been developed in recent years in the form of bis-choline tetrathiomolybdate (bis-choline TTM), with a similar mechanism of action but used once daily (Weiss *et al.*, 2017). Bis-choline TTM has a direct effect on hepatocyte function, binds copper into complexes, and increases its removal with bile, forms stable complexes with “free copper” (NCC) and albumin in serum, thereby reducing serum NCC concentrations and cellular copper uptake (Weiss *et al.*, 2017).

Bis-choline **TTM** (initially referred to as WTX101 in clinical trials, current name ALXN1840) for use in WD trials was introduced by Wilson Therapeutics (2014) and is still a very promising drug for the treatment of WD in

clinical trials (Weiss *et al.*, 2017) in the form of tablets taken once daily on an empty stomach (dose 15–60 mg depending on copper metabolism and additional tests).

In 2016, a phase II clinical trial with bis-choline TTM (WTX101) including patients from 11 centres in the US, UK, Germany, Poland, and Austria was completed (Weiss *et al.*, 2017). Twenty-eight adult patients (> 18 years of age) diagnosed with WD, without previous pharmacological treatment (32% of patients), or treated with chelating drugs or zinc salts for no longer than 24 months, with NCC levels above the lower limit of the norm, were enrolled in the trial. Patients with decompensated cirrhosis were excluded from participation. Initially, the daily dose was 15–60 mg in two divided doses, then treatment was modified to one dose per day. After 24 weeks 22 out of 28 patients completed the therapy (in 3 patients adverse effects occurred, which did not allow to continue the therapy; in 1 patient, the disease progression occurred; 2 patients did not comply with recommendations), in 20 patients criteria of therapeutic success were met (71% of patients) – among others, normalisation of the level of NCC complexes with the drug. The drug was mostly well tolerated, reported side effects included clinically asymptomatic elevations of hepatic indices in 39% of patients (AspAT, ALAT, GGTP, and ALP), in addition to headache, limb tremor, nausea, dry skin, and leukopenia. Serious side effects (in 25% of patients) included psychiatric disorders (psychotic symptoms, affective disorders, and personality disorders), gait disturbances, agranulocytosis, and neurological deterioration (presumably as the natural course of the disease) (Weiss *et al.*, 2017). The results of the trial were assessed as positive and the drug was approved for further clinical trials.

Following the acquisition of the rights to the WTX101 molecule by Alexion in 2018, the name of the formulation was changed to ALXN1840 and a Phase III prospective, randomised clinical trial is currently underway comparing the efficacy and safety of bis-choline TTM (ALXN1840) with standard treatment for WD – with DPA/TN or ZS (ClinicalTrials.gov identifier NCT03403205).

Further trials are planned with this drug, evaluating its (1) effects on CYP2C9 cytochrome metabolism in healthy volunteers: NCT04526197 (ClinicalTrials.gov Identifier) and (2) effects on CYP2B6 cytochrome metabolism in healthy volunteers: NCT04526210 (ClinicalTrials.gov Identifier). Trials with ALXN1840 in patients with WD included (1) the assessment of copper content in liver cells and histopathological changes in liver biopsy (ClinicalTrials.gov identifier NCT04422431) and (2) the assessment of copper and molybdenum metabolism in patients with WD receiving ALXN1840 or standard treatment for WD (ClinicalTrials.gov identifier NCT04573309).

Summarising the studies to date, it appears that bis-choline TTM may have an advantage over other drugs previously used to treat WD due to its dosing, i.e.

taking only one dose per day (impact on compliance – other drugs require administration three times a day), and good safety profile (especially regarding paradoxical worsening of neurological symptoms) (Tremmel, 2018).

#### 2.4. Methanobactin (MB)

Methanobactin (MB) is a peptide produced by the proteobacteria *Methylosinus trichosporium* OB3b that has a very high affinity for copper (Lichtmannegger *et al.*, 2016). Secreted by the described bacteria, it sequesters extracellular copper. Methanobactin penetrates the outer cell membranes of the bacteria, delivers copper to methane oxidase, and binds copper to copper storage proteins (such as copper storage protein 1, CSP1). It was compared with copper chelating drugs in animal models of WD, in rats with acute liver failure (Lichtmannegger *et al.*, 2016). It turned out that only MB was able to rapidly (within a few days) remove excess copper from hepatocyte mitochondria and stop the development of hepatitis and acute liver failure by repairing damaged mitochondria. There were no adverse reactions in the tested animals. On this basis, MB can be expected to be a promising new drug for patients with WD. However, previous studies with MB have only looked at animal models of WD, so further trials with MB are needed to demonstrate its efficacy and safety for use in WD (Lichtmannegger *et al.*, 2016).

#### 2.5. DPM-1001 (methyl4-[7-hydroxy-10,13-dimethyl-3-((4-[(pyridin-2ylmethyl)amino]butyl)amino)hexadecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]pentanoate)

DPM-1001 is a copper chelating agent (Krishnan *et al.*, 2018). Initially, its copper-binding properties were demonstrated *in vitro*, later these experiments were used and confirmed on fibroblasts collected from patients with WD, then in mouse animal models of WD. In mouse models of CHW compared with placebo, DPM-1001 reduces copper primarily in the liver and brain and increases copper excretion in the stool (Krishnan *et al.*, 2018). This preparation is taken orally; it has a high affinity for copper, and crosses the blood-brain barrier resulting in a reduction of copper concentrations in the CNS. DPM-1001 appears to be an attractive alternative for the treatment of WD, however, studies with this agent to date have only been conducted in animals and despite promising results, no human studies with this agent have not been yet conducted (Krishnan *et al.*, 2018).

#### 2.6. OSIP108

It is a plant decapeptide (derived from *Arabidopsis thaliana*) (Spincemaille *et al.*, 2014). It was initially discovered to increase the tolerance of plants and yeast to oxidative stress. In cellular models, OSIP108 has been shown to

reduce copper ion-related toxicity, decrease apoptosis and increase cell survival (glioma cells in copper toxicity models) (Spincemaille *et al.*, 2014). In *in vivo* animal models, OSIP180 reduced copper-induced hepatotoxicity in a zebrafish larvae model. At a dose of 5 mg/kg of body weight, it prevented changes in liver morphology associated with copper toxicity. These data are preliminary, promising, but require further study in animal models of WD.

#### 2.7. Curcumin

Curcumin is a polyphenol with anti-inflammatory, antioxidant, and copper chelating effects; it is another potential treatment option for WD (Ji & Shen, 2010; Farzaei *et al.*, 2018; Berzina *et al.*, 2018). Its main source is turmeric – a world-renowned seasoning. Curcumin works by removing free radicals, reducing lipid peroxidation and, chelating copper (forming curcumin-Cu<sup>2+</sup> complexes). An additional advantage is a possibility of transport across the BBB (Ji & Shen, 2010; Farzaei *et al.*, 2018; Berzina *et al.*, 2018). Due to the properties of curcumin, its use in the treatment of liver diseases of various etiologies is being analysed. In humans, two randomised, double-blind trials have been conducted in patients with non-alcoholic fatty liver disease using curcumin – 500 or 1000 mg/day for 8 weeks vs. placebo (Farzaei *et al.*, 2018; Berzina *et al.*, 2018). They showed improvement in liver function (reduction of liver enzymes concentration) and liver morphology (liver ultrasound). Curcumin can also be used as an excipient in the treatment of WD with other preparations, e.g. with 4-phenylbutyric acid (4-PBA) (van den Berghe *et al.*, 2009). However, so far, there have been no data on the use of curcumin in patients with WD.

#### 2.8. 4-phenylbutyric acid (4-PBA)

**4-phenylbutyric acid** is used in disorders of the Krebs (urea) cycle under the trade name Buphenyl (Peña-Quintana *et al.*, 2017). It prevents the aggregation of pathological proteins in the endoplasmic reticulum (*reticulum endoplasmaticum*, ER), reducing its damage and restoring its normal structure and function.

In WD studies, 4-PBA was used in cell cultures serving as a model to evaluate the expression and function of ATP7B protein – HEK239 (human embryonic kidney 293 cells) – together with curcumin. As a result of the experiment, it was found that the compound increased the expression and partially restored the function of the mutated ATP7B proteins, reducing the disturbance of copper metabolism (van den Berghe *et al.*, 2009).

The additional effect of curcumin as a free radical scavenger, anti-inflammatory drug, and copper chelating agent may improve the outcome of combination therapy using 4-PBA with curcumin (van den Berghe *et al.*, 2009).

### 3. Gene therapy

Gene therapy, and the consequent systemic repair of copper metabolism in the body by the transfer of the correct *ATP7B* gene, appears to be a very promising form of therapy for WD.

For asymptomatic patients with WD, gene therapy would prevent the onset of disease symptoms. In symptomatic patients, it would lead to normalisation of copper metabolism in the body, removal of copper deposits in tissues and ultimately resolution of disease symptoms (Roy-Chowdhury & Schilsky, 2016).

In studies using mouse and rat models of WD, the proper *ATP7B* gene is delivered to liver cells on a viral vector. Initially, lentivirus (LV) was used for this (Merle *et al.*, 2006). Currently, studies with AAV8 parvovirus as a vector are the most promising (Murillo *et al.*, 2016; Uerlings *et al.*, 2018). Studies in mouse models with AAV8 provide encouraging results. It has been shown to normalise copper metabolism with a reduction in liver and brain copper concentrations and improved liver function within 6 months after a single injection (Murillo *et al.*, 2016; Uerlings *et al.*, 2018). Chinese researchers, using a rat model of WD, used bone marrow stem cells as a vector to transfer the proper *ATP7B* gene and found a reduction in liver copper congestion (Chen *et al.*, 2014).

Gene therapies in WD are currently in the animal trial stage (Murillo *et al.*, 2016; Uerlings *et al.* 2018), although two phase I/II trial designs with gene therapy in patients with WD are being prepared independently. These studies include VTX-801 (sponsor Vivet Therapeutics; ClinicalTrials.gov identifier: NCT04537377) and UX701 (sponsor Ultragenyx Pharmaceutical Inc; ClinicalTrials.gov identifier: NCT04531189).

### 4. Cell therapies

Transplant of healthy hepatocytes is another treatment for WD tested in animal models (Pujol *et al.*, 2011; EASL, 2012). Liver transplant completely restores abnormal copper metabolism, but based on previous studies, it has been concluded that whole organ transplant is not necessary to normalise copper metabolism. As little as 40% of normal liver cells are sufficient for normal copper management in the body (Pujol *et al.*, 2011). Montreal researchers injected healthy hepatocytes into the spleen of 8-week-old rats with an animal model of WD (Park *et al.*, 2006). Autopsy studies determined that there was a reduction in copper stored in the liver, a reduction in the inflammatory reaction, and prolongation of 6-month survival, compared to animals that did not receive cell transplant. In the following years, these reports were confirmed in animal models of WD and showed that repeated hepatocyte transplant leads to better outcomes (Sauer *et al.*, 2012). However, this requires further observation. Currently, there are no studies using hepatocyte transplant involving patients with WD.

### Conclusions

Current treatment of WD is based on (1) copper chelating drugs (DPA, TN); (2) drugs that reduce gastrointestinal absorption of copper (ZS) or (3) liver transplant in case of acute liver failure (EASL, 2012; Członkowska *et al.* 2018). Currently, these are the only methods recommended by international scientific societies (Roberts & Schilsky 2008; EASL, 2012) as forms of therapy for WD. Out of many studies of new WD therapies presented herein (Table 1), the

**Table 1** Summary of current research on new drugs and forms of therapy for Wilson's disease

Preparation	Mechanism of action	Current status of the study
<b>Trientine (TN) used once daily</b>	Chelator	One study (8 patients) has been published
<b>Thermostable TN (TN tetrachloride)</b>	Chelator	Phase IV (drug registered in 2017)
<b>TN transported in liposomes across the blood-brain barrier</b>	Chelator	Animal testing
<b>Bis-choline tetrathiomolybdate (bis-choline TTM)</b>	Increases the excretion of copper in the bile Stabilises copper in the circulation by forming complexes (TTM-albumin-copper)	Phase III (FOCUS study) until 2021
<b>Methanobactin</b>	Chelator with protective properties for the mitochondrion	Animal testing
<b>DMP-1001</b>	Chelator that passes the blood-brain barrier	Animal testing
<b>OSIP108</b>	Reduces cellular copper toxicity and apoptosis	Animal testing
<b>Curcumin</b>	Chelator that passes the blood-brain barrier Removes free radicals Reduces lipid peroxidation	Lack of research in WD
<b>4-PBA</b>	Increases <i>ATP7B</i> expression and cellular repair processes	Animal testing
<b>Gene therapy</b>	Restores normal <i>ATP7B</i> function in hepatocytes	Phase I/II studies begin: VTX801 and UX701 (2021)
<b>Cell therapy</b>	Restores liver function by transplanting healthy hepatocytes	Animal testing

most advanced and promising are those with bis-choline TTM (Weiss *et al.*, 2017). There is also much hope for the treatment of WD in the coming years with gene therapy (Murillo *et al.*, 2016; Uerlings *et al.*, 2018). As outlined above, the results of studies in animal models are very promising, and in the near future, various corporations

will independently initiate trials on the application of gene therapy in WD (Phase I/II clinical trials). Other studies, such as hepatocyte transplant, despite encouraging results in cellular and animal models, have not yet entered the phase of clinical trials in humans, so it is difficult to talk about their prospects for use in patients with WD. ■

## 1. Wstęp

Choroba Wilsona jest chorobą uwarunkowaną genetycznie dziedziczną autosomalnie recesywnie, w przebiegu której dochodzi do patologicznego gromadzenia się miedzi w wielu narządach i tkankach (głównie w wątrobie i mózgu) z ich wtórnym uszkodzeniem. Gen odpowiedzialny za rozwój choroby (*ATP7B*) zlokalizowany jest na chromosomie 13 (13q14), składa się z 21 eksonów i koduje białko ATP-azę typu P (*ATP7B*) (EASL 2012). Ekspresja tego białka jest największa w wątrobie, ale znajdująca się ono także między innymi w mózgu, nerkach, sercu. *ATP-aza7B* to enzym przez błonowy, który w hepatocytach pośredniczy we wbudowywaniu miedzi w apoceruloplazminę, a przez kanalikę żółciową bierze również udział w wydalaniu miedzi do żółci. W przypadku patogenicznej mutacji w genie *ATP7B* zaburzona jest funkcja ATP-azy i miedź gromadzi się nadmiernie w hepatocytach, doprowadzając do ich uszkodzenia. Następnie pierwiastek ten w „postaci wolnej”, związanej luźno z albuminami oraz innymi drobnocząsteczkowymi białkami – niezwiązanej z ceruloplazminą, (*non-ceruloplasmin bound copper*, NCC) – dostaje się do krwiobiegu, uszkodzając kolejne narządy i powodując wystąpienie pozawątrobowych objawów klinicznych chW (EASL 2012; Członkowska i wsp. 2018). Pojęcie NCC wprowadzono w latach 50. XX wieku w diagnostyce i monitorowaniu leczenia chW (Roberts i Schilsky 2008; EASL 2012). U osób zdrowych stężenie miedzi w surowicy wynosi średnio 1 mg/l (norma: 70–140 µg/dl), z czego 65–95% jonów miedzi związanych jest z ceruloplazminą, a pozostała część głównie z albuminami, alfa2-makroglobuliną, aminokwasami, tzw. drobnocząsteczkowymi nośnikami miedzi (*small Cu carrier*, SCC) oraz transporterami miedzi o niskiej masie cząsteczkowej (*low-molecular-weight ligands*, LMW). Ta druga pula miedzi niezwiązana z ceruloplazminą, jest labilna kinetycznie, słabiej związana z transporterami, co za tym idzie łatwiej odkłada się w tkankach, ulega częściej reakcjom chemicznym (wytwarzającym wolne rodniki), uznawana jest za toksyczną, i nazywana jest właśnie terminem wolnej miedzi (NCC) (Brewer i wsp., 2009; Falcone i wsp., 2021). Paradoksalnie, w przebiegu nieleczonej chW całkowita zawartość miedzi, która jest w zasadzie odbiciem stężenia ceruloplazminy w surowicy jest obniżona (wtórnie do obniżonego stężenia ceruloplazminy), natomiast wzrasta

stężenie NCC > 15 µg/dl (norma: 5–15 µg/dl). W przypadku prawidłowej terapii chW stężenie NCC powinno być w normie jak w zdrowej populacji.

W diagnostyce i leczeniu chW wartość NCC oznacza się pośrednio (w wyniku obliczenia na podstawie wzoru matematycznego, który uwzględnia stężenie ceruloplazminy i miedzi w surowicy) i wynik jej może być też obciążony ryzykiem błędu ze względów metodologicznych. Istnieje rozbieżność w wynikach między różnymi laboratoriami, dlatego ważne jest, aby dla jednego pacjenta otrzymywać wyniki wykonywane przez to samo laboratorium (EASL, 2012). Niezależnie od tych wątpliwości stężenie NCC proponowane jest obecnie jako jeden z potencjalnych laboratoryjnych punktów końcowych większości badań leków w chW (Roberts i Schilsky, 2008; EASL, 2012; Weiss i Stremmel, 2014; Litwin i wsp. 2019). Trwają intensywne badania nad nowymi metodami oznaczania NCC (Poujois i wsp. 2017).

Choroba Wilsona może być skutecznie leczona lekami chelatującymi miedź – d-penicylamina (DPA) lub dwuchlorek trientyny (TN), substancjami zmniejszającymi wchłanianie miedzi z przewodu pokarmowego – sole cynku (ZS), a w sytuacjach szczególnych za pomocą przeszczepu wątroby (EASL, 2012; Członkowska i wsp., 2018). Stosując obecnie dostępne leczenie chW rokowanie dla pacjentów jest dobre w większości przypadków, a śmiertelność zbliżona do zdrowej populacji (Członkowska i wsp., 2005; Svetel i wsp., 2009; Bruha i wsp., 2011; Beinhardt i wsp., 2014; Członkowska i wsp., 2018). Warunkami dobrego rokowania są przede wszystkim: 1) wczesne rozpoznanie chW na etapie potencjalnie odwracalnych zmian w narządach oraz 2) prawidłowe przyjmowanie leków przeciwmiedziowych (*compliance*) (EASL, 2012). U około 85% pacjentów z chW udaje się uzyskać poprawę stanu klinicznego, zatrzymać postęp choroby, a u chorych bezobjawowych zapobiec rozwojowi objawów klinicznych (Schilsky, 2014). U około 15% pacjentów rokowanie jest niekorzystne, co najczęściej ma związek z: 1) przyjmowaniem leków niezgodnie z zaleceniami – do 26% pacjentów (Masełbas i wsp., 2019); 2) działaniami niepożądanymi leków przeciwmiedziowych – do 30% (EASL, 2012) w tym z wczesnymi, paradoksalnymi pogorszeniami objawów neurologicznych w wyniku leczenia lekami chelatującymi do 10% pacjentów (Brewer i wsp., 1987; Kim i wsp., 2013; Litwin i wsp., 2015) oraz 3) utrzymywaniem się

objawów neurologicznych mimo leczenia – do 50% pacjentów (Członkowska i wsp., 2005; Bruha i wsp., 2011; Weiss i Stremmel, 2014; Litwin i wsp., 2016; Członkowska i Litwin, 2017; Członkowska i wsp., 2018). Powyższe ograniczenia stały się przyczyną poszukiwania nowych, skuteczniejszych, bezpieczniejszych i wygodniejszych dla pacjenta w stosowaniu leków (termostabilne, stosowane raz dziennie) oraz terapii w chW (Litwin i wsp., 2018). W artykule przedstawiono przegląd literatury ostatnich lat dotyczący badań nad nowymi terapiami w chW.

### Przegląd piśmiennictwa

Przeprowadzono celowany przegląd literatury, artykułów dostępnych w bazie PubMed w języku angielskim, wyszukując hasła: „choroba Wilsona”, „perspektywy leczenia”, „terapia genowa”. Uwzględniono przeglądy, artykuły oryginalne, randomizowane badania kontrolowane, metaanalizy, rozdziały książek i streszczenia opublikowane do kwietnia 2021 roku. Poniżej zamieszczono podsumowanie zgromadzonych danych.

## 2. Leczenie farmakologiczne

### 2.1. Trientyna (TN, dwuchlorek) stosowana raz dziennie

Jednym z głównych wyzwań w farmakoterapii chW jest właściwe stosowanie leków przez pacjentów (Masełbas i wsp., 2019). Na nieprzestrzeganie zaleceń ma wpływ konieczność przyjmowania tradycyjnie stosowanych leków w terapii chW trzy razy dziennie, w odstępach między posiłkami (EASL, 2012). Z tego powodu zaproponowano stosowanie leku chelatującego – trientyny (TN) raz dziennie (Ala i wsp., 2015). Ala i wsp. (2015) przeprowadzili badanie prospektywne na grupie ośmiu pacjentów ze stabilną chW, stosując TN raz dziennie (15 mg/kg masy ciała) przez 12 miesięcy. W czasie obserwacji wszyscy pacjenci pozostali klinicznie stabilni i nikt nie został wykluczony z badania – kryterium wcześniejszego zakończenia udziału w badaniu był wzrost aminotransferazy alaninowej (ALAT) lub asparaginowej (AspAT) więcej niż dwukrotnie w porównaniu z wartością wyjściową. Badania metabolizmu miedzi również wskazywały na adekwatne leczenie (wydalanie miedzi w dobowej zbiorce moczu wynosiło średnio 313,4 ug/24 godziny). Na minus tej oceny należy zaliczyć to, że: 1) pacjenci byli już wcześniej leczeni z powodu chW (stabilna chW, a zmiany metabolizmu miedzi oraz zmiany obrazu klinicznego po zmniejszeniu dawki mogą nie wystąpić w ciągu roku); 2) badanie było przeprowadzone na bardzo małej grupie – tylko na ośmiu pacjentach z chW. Konieczne są dalsze prospektywne badania: optymalizujące dobową dawkę leków stosowanych w chW oraz schemat ich podawania, aby wyciągać dalsze wnioski odnośnie do możliwości przyjmowania TN raz dziennie w leczeniu chW (Ala i wsp., 2015).

### 2.2. Pochodne trientyny

#### A. Termostabilna TN (czterochlorek TN)

Stosowana od lat 70. XX wieku forma TN w postaci dwuchlorku jest cząsteczką niestabilną w temperaturze pokojowej i wymaga przechowywania w lodówce (2-8 stopni Celsjusza). Utrudnia to prawidłowe przyjmowanie leku przez pacjentów (np. w związku z pracą, podróżami) i dodatkowo lek zażywany jest 3-4 razy dziennie. Zmodyfikowana cząsteczka leku – czterochlorek TN – cechuje się termostabilnością oraz możliwością rzadszego przyjmowania. W 2017 roku Komitet ds. Produktów Medycznych dla Ludzi przy Europejskiej Agencji Leków (*European Medicines Agency*, EMA) dopuścił do zastosowania u pacjentów z chW > 5. roku życia tę formułę leku (Cuprior) w postaci tabletek (150 mg) podawanych 2-4 razy dziennie. Aktualnie lek ten jest w trakcie badania klinicznego, w którym porównywana jest skuteczność i bezpieczeństwo preparatu z leczeniem standardowym chW – DPA (EudraCT: 2016-003876-29).

#### B. TN transportowana w liposomach przez barierę krew–mózg

TN rutynowo stosowana w leczeniu chW jako doustny lek chelatujący miedź nie przechodzi przez barierę krew–mózg (*blood-brain barrier*, BBB), podobnie jak pozostałe leki stosowane aktualnie w leczeniu chW (DPA i ZS) (EASL, 2012; Członkowska i wsp., 2018). Teoretycznie leki potencjalnie przechodzące przez BBB powinny skuteczniej usuwać nadmiar miedzi z ośrodkowego układu nerwowego (OUN), prowadząc do efektywniejszego leczenia objawów neurologicznych chW. W 2016 roku badacze z Heidelbergu opracowali nowy system transportu dwuchlorku TN przez BBB (Tremmel i wsp., 2016). Stworzyli oni kapsułki ze zmodyfikowanych liposomów, które zawierały lek, tak by wiązały się z powierzchnią BBB, i testowali ich przenikanie przez BBB w szczurzych modelach zwierzęcych chW. Wyniki okazały się zachęcające – stwierdzono wysokie stężenie TN w mózgu (Tremmel i wsp., 2016). Badania te są w fazie wstępnej, nie przeprowadzono jeszcze testów w modelach doświadczalnych chW pod kątem oceny usuwania miedzi z OUN. Idea leku przechodzącego BBB jest bardzo interesująca, ale wymaga jeszcze wielu badań w celu potwierdzenia skuteczności i bezpieczeństwa tego preparatu, na razie w modelach zwierzęcych.

### 2.3. Sole molibdenu

Historycznie, tetratiomolibdenian (TTM) jako sól amonowa był eksperymentalnie stosowany w badaniach klinicznych w chW od lat 80. XX wieku (Brewer i wsp., 2006). Ma on podwójny mechanizm działania: 1) podawany z posiłkiem zapobiega wchłanianiu miedzi z przewodu pokarmowego przez tworzenie niewchłanianych z przewodu pokarmowego kompleksów miedzi z pokarmem



i TTM; 2) podawany na czczo usuwa miedź z hepatocytów (związaną z metalotioneinami) do żółci, a w krążeniu systemowym łączy się z NCC, tworząc stabilne kompleksy molibden–miedź–albumina (co uniemożliwia dostęp tej związanej miedzi dla innych tkanek i zapobiega wystąpieniu stresu oksydacyjnego), które następnie są wychwytywane przez wątrobę i wydalane do żółci, prowadząc do ujemnego bilansu miedzi w organizmie (Brewer i wsp., 2006, Rupp i wsp., 2019).

U pacjentów z chW przyjmujących sól amonową TTM rzadziej dochodziło do nasilenia objawów neurologicznych, w porównaniu z grupami chorych stosujących DPA i TN, co wiązano z brakiem szybkiego wzrostu w surowicy krwi NCC (Brewer i wsp., 2006). Mimo obiecujących rezultatów główne trudności w stosowaniu soli amonowej TTM w leczeniu chW wynikały z konieczności częstego dawkowania leku – sześć razy na dobę (trzy razy przed posiłkami i trzy razy po) i działań niepożądanych (niedokrwistość, leukopenia, wzrost aminotransferaz) (Brewer i wsp., 2006; Brewer i wsp., 2009; EASL, 2012). Ta postać leku nie została zarejestrowana do leczenia chW (stosowana była tylko w badaniach klinicznych) (Brewer i wsp., 2006; Brewer i wsp., 2009).

Głównie ze względu na trudności związane z koniecznością wielokrotnego przyjmowania soli amonowej TTM w ciągu doby opracowano w ostatnich latach nowy preparat pod postacią tetratiomolibdenianu bis-choliny (TTM bis-choliny), o podobnym mechanizmie działania, ale stosowany raz dziennie (Weiss i wsp., 2017). TTM bis-choliny ma bezpośredni wpływ na czynność hepatocytów, wiąże miedź w kompleksy i zwiększa usuwanie tego pierwiastka z żółcią, tworzy w surowicy krwi stabilne kompleksy z „wolną miedzią” (NCC) i albuminami, zmniejszając przez to stężenie NCC w surowicy i wychwyt miedzi przez komórki (Weiss i wsp., 2017).

**TTM bis-choliny** (początkowa nazwa w badaniach klinicznych WTX101, aktualna ALXN1840) do stosowania w badaniach w chW została wprowadzony przez Wilson Therapeutics (2014) i jest ciągle bardzo obiecującym lekiem stosowanym w leczeniu chW w próbach klinicznych (Weiss i wsp., 2017) w postaci tabletek przyjmowanych raz dziennie na czczo (dawka 15-60 mg w zależności od metabolizmu miedzi oraz badań dodatkowych).

W 2016 roku zakończyło się badanie kliniczne II fazy z TTM bis-choliny (WTX101), obejmujące pacjentów z 11 ośrodków z USA, Wielkiej Brytanii, Niemiec, Polski i Austrii (Weiss i wsp., 2017). Do badania zakwalifikowanych zostało 28 dorosłych pacjentów (> 18. r.ż.) z rozpoznaną chW, bez wcześniej stosowanego leczenia farmakologicznego (32% pacjentów), ewentualnie leczeni lekami chelatującymi lub solami cynku nie dłużej niż 24 miesiące, ze stężeniem NCC powyżej dolnej granicy normy. Z udziału wykluczeni zostali pacjenci ze zdekompensowaną marskością wątroby. Początkowo dawka dobową wynosiła 15-60 mg w dwóch dawkach podzielonych, następnie zmodyfikowano leczenie do jednej dawki na dobę. Po 24

tygodniach zakończyło je 22 z 28 pacjentów (w przypadku 3 chorych doszło do wystąpienia działań niepożądanych niepozwalających na dalsze kontynuowanie terapii, u jednej osoby doszło do progresji choroby, 2 chorych nie stosowano się do zaleceń), w tym 20 osób spełniało kryteria sukcesu terapeutycznego (71% pacjentów); m.in. normalizacja stężenia kompleksów NCC z lekiem. Lek był w większości przypadków dobrze tolerowany, do zgłaszanych działań niepożądanych należało bezobjawowe klinicznie podwyższenie wskaźników wątrobowych u 39% pacjentów (AspAT, ALAT, GGTP, ALP), poza tym były to bóle głowy, drżenia kończyn, nudności, suchość skóry, leukopenia. Do poważnych działań niepożądanych (u 25% pacjentów) zaliczały się zaburzenia psychiatryczne (objawy psychotyczne, zaburzenia afektywne, zaburzenia osobowości), zaburzenia chodu, agranulocytoza, pogorszenie stanu neurologicznego (prawdopodobnie jako naturalny przebieg choroby) (Weiss i wsp., 2017). Wyniki badania oceniono jako pozytywne i lek dopuszczono do dalszych badań klinicznych.

Po przejściu praw do cząsteczki WTX101 przez Alexion w 2018 roku nazwa preparatu została zmieniona na ALXN1840 i obecnie trwa badanie kliniczne fazy III prospektywne, randomizowane, porównujące skuteczność i bezpieczeństwo stosowania TTM bis-choliny (ALXN1840) z leczeniem standardowym chW – DPA/TN lub ZS (ClinicalTrials.gov identifier NCT03403205).

Planowane są kolejne badania z tym lekiem, oceniające jego: 1) wpływ na metabolizm cytochromu CYP2C9 u zdrowych ochotników: NCT04526197 (ClinicalTrials.gov Identifier); 2) wpływ na metabolizm cytochromu CYP2B6 u zdrowych ochotników: NCT04526210 (ClinicalTrials.gov Identifier). Badania z ALXN1840 u pacjentów z chW to: 1) ocena zawartości miedzi w komórkach wątroby oraz zmian histopatologicznych w biopsji wątroby (ClinicalTrials.gov identifier NCT04422431) i 2) ocena metabolizmu miedzi i molibdenu u pacjentów z chW przyjmujących ALXN1840 lub leczenie standardowe chW (ClinicalTrials.gov identifier NCT04573309).

Podsumowując dotychczasowe badania, wydaje się, że TTM bis-choliny może mieć zaletę w porównaniu z innymi lekami stosowanymi dotychczas w leczeniu chW, ze względu na dawkowanie – przyjmowanie tylko jednej dawki dziennie (wpływ na *compliance* – inne leki wymagają podawania trzy razy dziennie) oraz dobry profil bezpieczeństwa (zwłaszcza dotyczący paradoksalnego pogorszenia objawów neurologicznych) (Tremmel, 2018).

## 2.4. Metanobaktyna (MB)

Metanobaktyna (MB) to peptyd produkowany przez protobakterię *Methylosinus trichosporium* OB3b, który wykazuje bardzo wysokie powinowactwo do miedzi (Lichtmannegger i wsp., 2016). Wydzielany przez opisaną bakterię sekwestruje zewnątrzkomórkową miedź. Metanobaktyna przenika przez błony komórkowe zewnętrzne

bakterii, dostarcza miedź do oksydazy metanowej oraz wiąże miedź z białkami magazynującymi miedź (jak *copper storage protein 1*, CSP1). Była porównywana z lekami chelatującymi miedź w modelach zwierzęcych chW, u szczurów z ostrą niewydolnością wątroby (Lichtmannegger i wsp., 2016). Okazało się, że tylko MB była w stanie szybko (w ciągu kilku dni) usunąć nadmiar miedzi z mitochondrium hepatocytów oraz zatrzymać rozwój zapalenia wątroby i jej ostrą niewydolność przez naprawę uszkodzonych mitochondriów. Nie wykazano przy tym działań niepożądanych u badanych zwierząt. Na tej podstawie można oczekiwać, że MB będzie obiecującym nowym lekiem dla pacjentów z chW. Dotychczasowe badania z MB dotyczyły jednak tylko modeli zwierzęcych chW, dlatego dalsze testy z MB są konieczne w celu wykazania jej skuteczności i bezpieczeństwa stosowania w chW (Lichtmannegger i wsp., 2016).

### 2.5. DPM-1001 (methyl4-[7-hydroxy-10,13-dimethyl-3-({4-[(pyridin-2ylmethyl)amino]butyl}amino)hexadecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl] pentanoate)

DPM-1001 jest preparatem chelatującym miedź (Krishnan i wsp., 2018). Początkowo jego zdolności wiązania miedzi były wykazane *in vitro*, później doświadczenia te zostały wykorzystane i potwierdzone na fibroblastach pobranych od pacjentów z chW, następnie w mysich modelach zwierzęcych chW. W modelach mysich chW w porównaniu z placebo DPM-1001 zmniejsza zawartość miedzi przede wszystkim w wątrobie i mózgu oraz zwiększa wydalanie miedzi z kałem (Krishnan i wsp., 2018). Preparat ten przyjmowany jest doustnie, ma wysokie powinowactwo do miedzi i przekracza barierę krew-mózg, co skutkuje redukcją stężenia miedzi w OUN. DPM-1001 wydaje się atrakcyjną alternatywą w leczeniu chW, jednak dotychczasowe badania z tym preparatem przeprowadzono tylko na zwierzętach i mimo obiecujących rezultatów nie są jeszcze wykonywane żadne badania z tym preparatem z udziałem ludzi (Krishnan i wsp., 2018).

### 2.6. OSIP108

Jest to decapeptyd roślinny (pochodzi z *Arabidopsis thaliana*) (Spincemaille i wsp., 2014). Początkowo odkryto, że zwiększa on tolerancję roślin i drożdży na stres oksydacyjny. W modelach komórkowych wykazano, że OSIP108 zmniejsza toksyczność związaną z jonami miedzi, zmniejsza apoptozę i zwiększa przeżywalność komórek (komórek glejaka w modelach toksyczności miedzi) (Spincemaille i wsp., 2014). W modelach zwierzęcych *in vivo* OSIP180 zmniejszał hepatotoksyczność wywołaną miedzią w modelu larw danio przegowanego (zebrafish). W dawce 5 mg/kg masy ciała zapobiegał zmianom morfologii wątroby związanym z toksycznością miedzi. Dane te są wstępne, obiecujące, ale wymagają dalszych badań na modelach zwierzęcych chW.

### 2.7. Kurkumina

Kurkumina to polifenol o działaniu przeciwzapalnym, przeciwutleniającym i chelatującym miedź; jest kolejną potencjalną opcją leczenia chW (Ji i Shen, 2010; Farzaei i wsp., 2018; Berzina i wsp., 2018). Jej głównym źródłem jest kurkuma, znana na całym świecie przyprawa. Kurkumina działa przez usuwanie wolnych rodników, zmniejszanie peroksydacji lipidów i chelatowanie miedzi (tworzenie kompleksów kurkumina-Cu<sup>2+</sup>). Dodatkowym atutem jest możliwość transportu przez BBB (Ji i Shen, 2010; Farzaei i wsp., 2018; Berzina i wsp., 2018). Ze względu na właściwości kurkuminy analizowane jest jej wykorzystanie w leczeniu chorób wątroby o różnej etiologii. U ludzi przeprowadzono dwa randomizowane, podwójnie zaślepienie badania u pacjentów z niealkoholowym stłuszczeniem wątroby z zastosowaniem kurkuminy – 500 lub 1000 mg/dobę przez 8 tygodni vs. placebo (Farzaei i wsp., 2018; Berzina i wsp., 2018). Wykazano w nich poprawę czynności wątroby (zmniejszenie stężenia enzymów wątrobowych) oraz jej morfologii (badanie ultrasonograficzne wątroby). Kurkumina może być również substancją pomocniczą w leczeniu chW przy stosowaniu innych preparatów, np. z kwasem 4-fenylomasłowym (4-PBA) (van den Berghe i wsp., 2009). Jak dotąd nie ma jednak danych dotyczących stosowania kurkuminy u pacjentów z chW.

### 2.8. Kwas 4-fenylomasłowy (4-PBA)

**Kwas 4-fenylomasłowy** stosowany jest w zaburzeniach cyklu Krebsa (mocznikowego) pod nazwą handlową Buphenyl (Peña-Quintana i wsp., 2017). Zapobiega on agregacji patologicznych białek w siateczce endoplazmatycznej (*reticulum endoplasmaticum*, ER), zmniejszając jej uszkodzenia oraz przywracając prawidłową budowę i funkcję.

W badaniach w chW 4-PBA był stosowany w hodowlach komórkowych służących jako model oceny ekspresji oraz funkcji białka ATP7B – HEK239 (*human embryonic kidney 293 cells*) – razem z kurkumina. W efekcie eksperymentu stwierdzono, że związek ten zwiększał ekspresję i przywracał częściowo funkcję zmutowanym białkom ATP7B, zmniejszając zaburzenia metabolizmu miedzi (van den Berghe i wsp., 2009).

Dodatkowy wpływ kurkuminy jako wymiatacza wolnych rodników, leku przeciwzapalnego, chelatującego miedź, może poprawić wyniki leczenia skojarzonego 4-PBA z kurkumina (van den Berghe i wsp., 2009).

## 3. Terapia genowa

Terapia genowa, i w konsekwencji systemowa naprawa metabolizmu miedzi w organizmie przez transfer prawidłowego genu *ATP7B*, wydaje się bardzo obiecującą formą terapii chW.

W przypadku bezobjawowych pacjentów z chW terapia genowa zapobiegałaby wystąpieniu objawów choroby. U pacjentów objawowych prowadziłaby do normalizacji metabolizmu miedzi w organizmie, usunięcia depozytów miedzi w tkankach i ostatecznie do ustąpienia objawów choroby (Roy-Chowdhury i Schilsky, 2016).

W badaniach z wykorzystaniem mysich i szczurzych modeli chW, prawidłowy gen *ATP7B* jest dostarczany do komórek wątroby na wektorze wirusowym. Początkowo używano do tego lentiwirusa (LV) (Merle i wsp., 2006). Obecnie najbardziej obiecująco zapowiadają się badania z parwowirusem AAV8 jako wektorem (Murillo i wsp., 2016; Uerlings i wsp., 2018). Badania w modelach mysich z AAV8 dostarczają zachęcających wyników. Wykazano, że dochodzi do normalizacji metabolizmu miedzi z redukcją stężenia miedzi w wątrobie i mózgu oraz poprawy czynności wątroby w ciągu 6 miesięcy po jednorazowej iniekcji (Murillo i wsp., 2016; Uerlings i wsp., 2018). Chińscy badacze, wykorzystując szczurzy model chW, użyli komórek macierzystych szpiku kostnego jako nośnika do transferu prawidłowego genu *ATP7B* i stwierdzili zmniejszenie przeciążenia wątroby miedzią (Chen i wsp., 2014).

Terapie genowe w chW są obecnie na etapie badań na zwierzętach (Murillo i wsp., 2016; Uerlings i wsp. 2018), aczkolwiek przygotowywane są niezależnie dwa projekty badań fazy I/II z terapią genową u pacjentów z chW. Są to badania: VTX-801 (sponsor Vivet Therapeutics; ClinicalTrials.gov identifier: NCT04537377) oraz UX701 (sponsor Ultragenyx Pharmaceutical Inc; ClinicalTrials.gov identifier: NCT04531189).

#### 4. Terapie komórkowe

Kolejną metodą leczenia chW testowaną na modelach zwierzęcych jest przeszczepianie zdrowych hepatocytów (Pujol i wsp., 2011; EASL, 2012). Przeszczep wątroby całkowicie przywraca do normy nieprawidłowy metabolizm miedzi, ale na podstawie dotychczasowych badań stwierdzono, że nie jest konieczna transplantacja całego narządu do normalizacji metabolizmu miedzi. Już 40% prawidłowych komórek wątroby wystarczy do uzyskania prawidłowych parametrów gospodarki miedzi w organizmie (Pujol i wsp., 2011). Badacze z Montrealu podali w formie zastrzyków do śledziony zdrowe hepatocyty 8-tygodniowym szczurom ze zwierzęcym modelem chW (Park i wsp., 2006). Na podstawie badań autopsyjnych ustalono, że doszło do redukcji miedzi zmagazynowanej w wątrobie, zmniejszenia odczynu zapalnego oraz wydłużenia 6-miesięcznego przeżycia, w porównaniu ze zwierzętami, którym nie przeszczepiono komórek. W kolejnych latach potwierdzono te doniesienia w modelach zwierzęcych chW oraz wykazano, że powtarzanie przeszczepiania hepatocytów prowadzi do lepszych rezultatów (Sauer i wsp., 2012). Wymaga to jednak dalszych obserwacji. Obecnie nie są prowadzone badania z użyciem przeszczepu hepatocytów z udziałem pacjentów z chW.

#### Wnioski

Aktualne leczenie chW opiera się na: 1) lekach chelatujących miedź (DPA, TN); 2) lekach zmniejszających

**Tabela 1** Podsumowanie aktualnych badań dotyczących nowych leków oraz form terapii w chorobie Wilsona

Preparat	Mechanizm działania	Aktualny stan zaawansowania badania
<b>Trientyna (TN) stosowana raz dziennie</b>	Chelator	Opublikowano jedno badanie (8 pacjentów)
<b>TN termostabilna (czterochlorek TN)</b>	Chelator	Faza IV (lek zarejestrowany w 2017 roku)
<b>TN transportowana w liposomach przez barierę krew–mózg</b>	Chelator	Badania na zwierzętach
<b>Tetrathiomolibdenian bis- cholinyl (TTM bis-cholinyl)</b>	Zwiększa wydalanie miedzi z żółcią Stabilizuje miedź w krążeniu przez tworzenie kompleksów (TTM–albumina–miedź)	Faza III (badanie FOCUS) do 2021 roku
<b>Metanobaktyna</b>	Chelator z właściwościami protekcyjnymi dla mitochondrium	Badania na zwierzętach
<b>DMP-1001</b>	Chelator przechodzący przez barierę krew–mózg	Badania na zwierzętach
<b>OSIP108</b>	Zmniejsza toksyczność komórkową miedzi i apoptozę	Badania na zwierzętach
<b>Kurkumina</b>	Chelator przechodzący przez barierę krew–mózg, Usuwa wolne rodniki Zmniejsza peroksydację lipidów	Brak badań w chW
<b>4-PBA</b>	Zwiększa ekspresję <i>ATP7B</i> oraz procesy naprawcze komórkowe	Badania na zwierzętach
<b>Terapia genowa</b>	Przywraca normalną funkcję <i>ATP7B</i> w hepatocytach	Rozpoczynają się badania fazy I/II: VTX801 oraz UX701 (2021 rok)
<b>Terapia komórkowa</b>	Przywraca funkcję wątroby przez transplantację zdrowych hepatocytów	Badania na zwierzętach

wchłanianie miedzi z przewodu pokarmowego (ZS) lub 3) przeszczepie wątroby w przypadku ostrej niewydolności wątroby (EASL, 2012; Członkowska i wsp. 2018). Obecnie są to jedyne metody rekomendowane przez międzynarodowe towarzystwa naukowe (Roberts i Schilsky 2008; EASL, 2012) jako formy terapii chW. Z wielu badań nad nowymi terapiami chW przedstawionymi w niniejszym artykule (Tab. 1) najbardziej zaawansowane i obiecujące są badania z TTM bis-choliny (Weiss i wsp., 2017). Dużą nadzieję na leczenie chW w najbliższych latach można wiązać również z terapią genową (Murillo

i wsp., 2016; Uerlings i wsp., 2018). Jak przedstawiono powyżej w artykule, wyniki badań w modelach zwierzęcych są bardzo obiecujące, a w najbliższym czasie różne korporacje rozpoczną niezależnie badania nad zastosowaniem terapii genowej w chW (faza I/II badań klinicznych). Pozostałe badania, jak przeszczepy hepatocytów, mimo zachęcających rezultatów w modelach komórkowych i zwierzęcych, nie weszły jeszcze w fazy badań klinicznych u ludzi, dlatego trudno mówić aktualnie o ich perspektywie do zastosowania u pacjentów z chW. ■

Conflict of interest and financial support non declared. / Nie zgłoszono konfliktu interesów oraz dofinansowania.

The work described in this article has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, and Uniform Requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. / Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

Authors' contributions / Wkład autorów: AA – drafting the first version of the article, compiling the literature, making critical corrections, accepting the final version of the paper / napisanie pierwszej wersji artykułu, zebranie piśmiennictwa, wniesienie krytycznych poprawek, akceptacja ostatecznej wersji pracy; TL – drafting the first version of the article, compiling the literature, making critical corrections, accepting the final version of the paper / napisanie pierwszej wersji artykułu, zebranie piśmiennictwa, wniesienie krytycznych poprawek, akceptacja ostatecznej wersji pracy; MS – compiling the literature, making critical corrections, accepting the final version of the paper / zebranie piśmiennictwa, wniesienie krytycznych poprawek, akceptacja ostatecznej wersji pracy; IK-J – compiling the literature, making critical corrections, accepting the final version of the paper / zebranie piśmiennictwa, wniesienie krytycznych poprawek, akceptacja ostatecznej wersji pracy; ACz – compiling the literature, making critical corrections, accepting the final version of the paper / zebranie piśmiennictwa, wniesienie krytycznych poprawek, akceptacja ostatecznej wersji pracy.

## References / Piśmiennictwo

- Ala A, Aliu E, Schilsky ML. Prospective pilot study of single daily dose of trientine for the treatment of Wilson's disease. *Dig Dis Sci* 2015; 60: 1433-1439.
- Beinhardt S, Leiss W, Stättermayer AF, Graziadei I, Zoller H, Stauber R *et al.* Long term outcomes of patients with Wilson disease in large Austrian cohort. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014; 12: 683-689.
- Berzina A, Martinsone I, Svirskis S, Murovska M, Kalis M. Curcumin effect on copper transport in HepG2 cells. *Medicina* 2018; 54: 14.
- Brewer GJ, Terry CA, Aisen AM, Hill GM. Worsening of neurologic syndrome in patients with Wilson's disease with initial penicillamine therapy. *Arch Neurol* 1987; 44: 490-493.
- Brewer G, Askari F, Lorincz MT, Carlson M, Schilsky ML, Kluin KJ *et al.* Treatment of Wilson disease with ammonium tetrathiomolybdate: IV. Comparison of tetrathiomolybdate and trientine in double-blind study of treatment of the neurologic presentation of Wilson disease. *Arch Neurol* 2006; 63: 521-527.
- Brewer G, Askari F, Dick RB, Sitterly J, Fink JK, Carlson M *et al.* Treatment of Wilson disease with tetrathiomolybdate: V. Control of free copper by tetrathiomolybdate and a comparison with trientine. *Transl Res* 2009; 154(2): 70-77.
- Bruha R, Marecek Z, Pospisilova L, Nevsimalova S, Vitek L, Martasek P *et al.* Long-term follow-up of Wilson disease: natural history, treatment, mutations analysis and phenotypic correlation. *Liver Int* 2011; 31(1): 83-91.
- Chen S, Shao C, Dong T, Chai H, Xiong X, Sun D *et al.* Transplantation of ATP7B-transduced bone marrow mesenchymal stem cells decreases copper overload in rats. *PlosOne* 2014; 9(11): e111425.
- Członkowska A, Litwin T, Dusek P, Ferenci P, Lutsenko S, Medici V *et al.* Wilson Disease. *Nat Rev Dis Primers* 2018; 4(1): 21.
- Członkowska A, Tarnacka B, Litwin T, Gajda J, Rodo M. Wilson's disease – cause of mortality in 164 patients during 1992-2003 observation period. *J Neurol* 2005; 252(6): 698-703.
- Członkowska A, Litwin T. Wilson disease – currently used anticopper therapy. W: Członkowska A, Schilsky ML (red.), *Wilson Disease*, Elsevier. Amsterdam 2017; 181-191.
- Członkowska A, Litwin T, Karliński M, Dziezyc K, Chabik G, Czraska M. D-penicillamine versus zinc sulfate s first-line therapy for Wilson's Disease. *Eur J Neurol* 2014; 21: 599-606.
- European Association for Study of Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. *J Hepatol* 2012; 56(3): 671-685.
- Falcone E, Okafor M, Vitale N, Raibaut L, Sour A, Faller P. Extracellular Cu<sup>2+</sup> pools and their detection: From current knowledge to next-generations probes. *Coordination Chemistry Reviews* 2021; 433(21).
- Farzaei MH, Zobeiri M, Parvizi F, El-Senduny FF, Marmouzi I, Coy-Barrera E *et al.* Curcumin in liver diseases: a systematic review of the cellular mechanisms of oxidative stress and clinical perspectives. *Nutrients* 2018; 10: 855.

16. Ji HF, Shen L. Potential of curcumin as a multifunctional agents to combat Wilson disease. *Hepatology* 2010; 51(6): 2226.
17. Kim B, Chung SJ, Shin HW. Trientine-induced neurological deterioration in patient with Wilson's disease. *J Clin Neurosci* 2013; 20: 1398-1401.
18. Krishnan N, Felice C, Rivera K, Pappin DJ, Tonks NK. DPM-1001 decreased copper levels and ameliorated deficits in a mouse model of Wilson's disease. *Genes Dev* 2018; 32: 944-952.
19. Lichtmannegger J, Leitzinger C, Wimmer R, Schmitt S, Schulz S, Kabiri Y *et al.* Methanobactin reverse acute liver failure in rat model of Wilson disease. *J Clin Inv* 2016; 126: 2721-2735.
20. Litwin T, Dzieżyc K, Karliński M, Chabik G, Czepiel W, Czlonkowska A. Early neurological worsening in patients with Wilson's Diseases. *J Neurol Sci* 2015; 355: 162-167.
21. Litwin T, Dusek P, Czlonkowska A. Neurological manifestations in Wilson's disease possible treatment options for symptoms. *Expert Opin on Orphans Drugs* 2016; 4(7): 719-728.
22. Litwin T, Dzieżyc K, Czlonkowska A. Wilson disease-treatment perspectives. *Ann Transl Med*, 2019; Suppl 2; S68.
23. Masełbas W, Czlonkowska A, Litwin T, Niewada M. Persistence with treatment for Wilson disease: a retrospective study. *BMC Neurology* 2019; 19: 278.
24. Merle U, Encke J, Tuma S, Volkmann M, Naldini L, Stremmel W. Lentiviral gene transfer ameliorates disease progression in Long-Evans cinnamon rats: an animal model for Wilson disease. *Scand J Gastroenterol* 2006; 12: 2239-2242.
25. Murillo O, Luqui DM, Gazquez C, Martinez-Espartosa D, Navarro-Blasco I, Monreal JI *et al.* Long-term correction of Wilson's disease in a murine model by gene therapy. *J Hepatol* 2016; 64: 419-426.
26. Park SM, Vo K, Lallier M, Cloutier AS, Brochu P, Alvarez F, *et al.* Hepatocyte transplantation in the Long Evans Cinnamon rat model of Wilson's disease. *Cell Transplantation* 2006; 15: 13-22.
27. Peña-Quintana L, Llarena M, Reyes-Suárez D, Aldámiz-Echevarria L. Profile of sodium phenylbutyrate granules for the treatment of urea-cycle disorders: patient perspectives. *Patient Prefer Adherence* 2017; 11: 1489-1496.
28. Poujois A, Trocetto JM, Djebrani-Oussedik N, Poupon J, Collet C, Girardot-Tinant N *et al.* Exchangeable copper: a reflection of the neurological severity in Wilson's disease. *Eur J Neurol* 2017; 24: 154-160.
29. Pujol M, Cuillel M, Renaudet O, Lebrun C, Charbonnier P, Cassio D *et al.* Hepatocyte targeting and intracellular copper chelation by a thiol-containing glycocyclopeptide. *J Am Chem Soc* 2011; 133: 286-296.
30. Roberts E, Schilsky M, American Association for Study of Liver Diseases (AASLD). Diagnosis and treatment of Wilson's disease an update. AASLD Practice Guidelines. *Hepatology* 2008; 47: 2089-2111.
31. Roy-Chowdhury J, Schilsky ML. Gene therapy of Wilson disease: a „golden” opportunity using rAAV on the 50th anniversary of the discovery of the virus. *J Hepatol* 2016; 64: 265-267.
32. Rupp C, Weiss KH. Tetrathiomolibdate. W: Weiss KH, Schilsky M (red.), Wilson disease. Pathogenesis, molecular mechanism, diagnosis, treatment and monitoring. 2019, Elsevier, 197-201.
33. Sauer V, Sijaj R, Stöppeler S, Bahde R, Spiegel HU, Köhler G *et al.* Repeated transplantation of hepatocytes prevents fulminant hepatitis in a rat model of Wilson's disease. *Liver Transplantation* 2012; 18: 248-259.
34. Schilsky ML. Long-term outcome for Wilson disease: 85% good. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014; 12: 690-691.
35. Spincemaille P, Pham DH, Chandhok G, Verbeek J, Zibert A, Libbrecht L *et al.* The plant decapeptide OSIP108 prevents copper-induced toxicity in various models for Wilson disease. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2014; 280: 345-351.
36. Svetel M, Pekmezović T, Petrović I, Tomić A, Kresojević N, Jesić R *et al.* Long-term outcome in Serbian patients with Wilson disease. *Eur J Neurol* 2009; 16: 852-857.
37. Tremmel R, Uhl P, Helm F, Wupperfeld D, Sauter M, Mier W *et al.* Delivery of copper-chelating trientine (TETA) to the central nervous system by surface modified liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 2016; 512: 87-95.
38. Uerlings R, Moreno D, Murillo O, Gazquez C, Hernández-Alcoceba R, González-Aseguinolaza G *et al.* Brain copper storage after genetic long-term correction in a mouse model of Wilson disease. *Neurol Genet* 2018; 4(3):e243.
39. Weiss KH, Stremmel W. Clinical considerations for an effective medical therapy in Wilson's disease. *Ann N Y Sci* 2014; 1315: 81-85.
40. Weiss KH, Askari FK, Czlonkowska A, Ferenci P, Bronstein JM, Bega D *et al.* Bis-choline tetrathiomolybdate in patients with Wilson's disease: an open label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2017; 2: 869-876.
41. Van den Berghe PVE, Stapelbroek JM, Kriegera E, de Bie P, van de Graaf SFJ, de Groot REA *et al.* Reduced expression of ATP7B affected by Wilson disease-causing mutations is rescued by pharmacological folding chaperones 4-phenylbutyrate and curcumin. *Hepatology* 2009; 50: 1783-1795.

