

Mauro Giacca

TERAPIA GENICA



Springer

SPRINGER BIOMED

TERAPIA GENICA

Mauro Giacca

TERAPIA GENICA

MAURO GIACCA
Centro Internazionale di Ingegneria Genetica
e Biotecnologia
(ICGEB)
Trieste

ISBN 978-88-470-1988-1

ISBN 978-88-470-1989-8 (eBook)

DOI 10.1007/978-88-470-1989-8

© Springer-Verlag Italia 2011

Quest'opera è protetta dalla legge sul diritto d'autore, e la sua riproduzione è ammessa solo ed esclusivamente nei limiti stabiliti dalla stessa. Le fotocopie per uso personale possono essere effettuate nei limiti del 15% di ciascun volume dietro pagamento alla SIAE del compenso previsto dall'art. 68, commi 4 e 5, della legge 22 aprile 1941 n. 633. Le riproduzioni per uso non personale e/o oltre il limite del 15% potranno avvenire solo a seguito di specifica autorizzazione rilasciata da AIDRO, Corso di Porta Romana n. 108, Milano 20122, e-mail segreteria@aidro.org e sito web www.aidro.org.

Tutti i diritti, in particolare quelli relativi alla traduzione, alla ristampa, all'utilizzo di illustrazioni e tabelle, alla citazione orale, alla trasmissione radiofonica o televisiva, alla registrazione su microfilm o in database, o alla riproduzione in qualsiasi altra forma (stampata o elettronica) rimangono riservati anche nel caso di utilizzo parziale. La violazione delle norme comporta le sanzioni previste dalla legge.

L'utilizzo in questa pubblicazione di denominazioni generiche, nomi commerciali, marchi registrati, ecc. anche se non specificatamente identificati, non implica che tali denominazioni o marchi non siano protetti dalle relative leggi e regolamenti.

Responsabilità legale per i prodotti: l'editore non può garantire l'esattezza delle indicazioni sui dosaggi e l'impiego dei prodotti menzionati nella presente opera. Il lettore dovrà di volta in volta verificarne l'esattezza consultando la bibliografia di pertinenza.

9 8 7 6 5 4 3 2 1

2011 2012 2013 2014

Layout copertina: Simona Colombo, Milano

Impaginazione: Graphostudio, Milano

Stampa: Arti Grafiche Nidasio, Assago (MI)

Stampato in Italia

Springer-Verlag Italia S.r.l., Via Decembrio 28, I-20137 Milano

Springer fa parte di Springer Science+Business Media (www.springer.com)

*A Serena, Massimo e Giovanna,
senza cui nulla sarebbe possibile.*

M.G.

Prefazione

Mi sono affacciato al mondo della terapia genica all'inizio degli anni '90, affascinato dall'immenso potenziale che l'utilizzo dei geni offriva alla medicina, alla ricerca di nuove metodologie per risolvere problemi terapeutici insolubili. Fin da allora ho vissuto in maniera stretta i successi e gli insuccessi di questa disciplina, cercando in particolare di contribuire con il lavoro del mio laboratorio allo sviluppo di soluzioni terapeutiche innovative per le malattie cardiovascolari. Nel corso di questi anni, ho avuto modo di parlare in molteplici occasioni in Italia e in giro per il mondo sulla terapia genica, a livello sia accademico sia divulgativo, e ho costantemente notato che il campo è di grande interesse per scienziati di tutte le discipline. Cosa più affascinante, di fatto, della possibilità di affrontare e curare le malattie utilizzando l'informazione genetica stessa o modulandone direttamente l'espressione?

Nonostante quest'interesse diffuso, tuttavia, un libro che fosse in qualche modo comprensivo dell'intera disciplina della terapia genica non esisteva, limitandosi la maggior parte delle opere pubblicate a descrivere in maniera troppo tecnica settori specialistici, rappresentando quindi dei manuali per gli addetti ai lavori, o a presentare l'argomento in maniera troppo divulgativa e superficiale. Da queste considerazioni è nata l'idea di scrivere un volume che avesse l'ambizione di essere una sorta di libro di testo, tale da coprire l'intero campo della terapia genica, ma che allo stesso tempo utilizzasse un linguaggio semplice dal punto di vista tecnico, in modo da poter essere letto e consultato dallo studente di dottorato, dal ricercatore formato e attratto dalla disciplina, o dal clinico che cerca di comprendere i principi di base su cui le metodologie del trasferimento genico o la scelta degli acidi nucleici terapeutici si basano. Dal momento che il libro si rivolge sia a ricercatori di base sia a medici clinici, ho inserito quante più descrizioni possibili, al fine di soddisfare le rispettive necessità di approfondimento. Ad esempio, il lettore clinico può trovare difficile comprendere il razionale della costruzione dei vettori retrovirali senza conoscere la biologia del ciclo replicativo dei retrovirus, mentre il ricercatore di base può ignorare le esigenze cliniche del paziente con scompenso cardiaco e come queste si correlino con la fisiopatologia di questa malattia. In entrambi i casi, il libro fornisce le rilevanti informazioni.

Il volume si apre fornendo una visione ampia del campo della terapia genica e dei suoi sviluppi storici (Capitolo 1), per poi proseguire con la descrizione accurata degli strumenti della terapia genica, ovvero gli acidi nucleici con funzione

terapeutica (Capitolo 2) e le modalità con cui essi possono essere somministrati ai pazienti (Capitolo 3). Il lungo Capitolo 4 riporta un'estesa descrizione delle condizioni cliniche che la terapia genica ha finora affrontato, descrivendo i successi e le delusioni ottenute in oltre 20 anni di sperimentazione. A questo proposito, mi preme sottolineare che il libro intende essere un vero libro di "terapia" genica, considerando soltanto quelle condizioni in cui la sperimentazione è effettivamente arrivata al paziente, e trascurando la grande mole di studi biofisici, chimici o di biologia molecolare che si sono limitati alla ricerca di laboratorio o alla sperimentazione sugli animali. Infine, i molteplici problemi sociali ed etici connessi all'uso dei geni ed alla potenziale modificazione dell'informazione genetica umana sono trattati nel Capitolo 5. Oltre a discutere delle problematiche connesse alla sicurezza delle sperimentazioni sui pazienti, questo capitolo affronta i problemi relativi sia al trasferimento genico nelle cellule germinali, nell'utero, sia alla possibilità di utilizzare la terapia genica per condizioni non propriamente mediche, quali il doping genetico o la cosmesi.

Il contenuto del volume ha già costituito la base per una serie di corsi accademici che ho avuto modo di tenere, negli ultimi anni, presso la Scuola Normale di Pisa, l'Università di Trieste e alcune Università in altri Paesi. Questi corsi sono stati frequentati da studenti dei corsi magistrali in biologia o biotecnologie mediche, studenti del corso di medicina negli ultimi anni di studio, medici specializzandi in diversi settori della medicina interna o delle discipline specialistiche, nonché studenti di dottorato e ricercatori in vari campi della moderna ricerca biomedica.

Curare le malattie umane utilizzando l'informazione genetica rappresenta una delle sfide più difficili e allo stesso tempo più stimolanti della scienza, e gli ostacoli tecnologici da superare rimangono ancora molti. Tuttavia, sono fermamente convinto che, quando questi saranno definitivamente superati, la terapia genica offrirà una vasta e precedentemente insperata gamma di soluzioni a malattie che oggi necessitano disperatamente dello sviluppo di terapie innovative.

Trieste, febbraio 2011

Mauro Giacca

Ringraziamenti

I miei più sinceri ringraziamenti ad Oscar Burrone, Serena Zacchigna, Lorena Zentilin e Miguel Mano per la lettura critica del testo e a Suzanne Kerbavcic per il suo prezioso aiuto. Molti ringraziamenti anche a tutti gli altri membri del mio laboratorio presso l'International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology di Trieste per aver contribuito a mantenere un ambiente scientifico e intellettuale molto stimolante durante questi anni.

Mauro Giacca

Indice

Capitolo 1 – Introduzione alla terapia genica	1
Geni come farmaci	1
Terapia genica: una visione d’insieme	4
Scelta del gene terapeutico	4
Modalità di somministrazione dei geni terapeutici	5
Sistemi di trasferimento genico	6
<i>Targeting</i> cellulare	6
Persistenza del gene terapeutico	7
Espressione del gene terapeutico	8
Risposta immunitaria alla terapia genica	9
Letture consigliate	9
Capitolo 2 – Acidi nucleici con funzione terapeutica	11
Geni codificanti proteine	11
Proteine sostitutive di proteine cellulari assenti o mutate	13
Proteine che modulano funzioni cellulari	13
Fattori di crescita secreti e citochine	13
Proteine che regolano la sopravvivenza cellulare e l’apoptosi	14
Antigeni per la vaccinazione	14
Anticorpi e anticorpi intracellulari	15
Subunità del <i>T-cell receptor</i> (TCR)	17
Controllo dell’espressione dei geni terapeutici	18
Acidi nucleici non codificanti	19
Oligonucleotidi	20
Oligonucleotidi modificati	22
Applicazioni cliniche degli oligonucleotidi	25
Acidi nucleici catalitici	27
Piccoli RNA con funzione regolatoria (siRNA, microRNA) ..	30
<i>Decoy</i>	35
Aptameri	35
Modalità di somministrazione o sintesi intracellulare dei piccoli RNA regolatori	36
Letture consigliate	39

Capitolo 3 – Metodologie per il trasferimento genico	41
Barriere cellulari al trasferimento genico	41
Endocitosi	41
Fuoriuscita dal compartimento vescicolare	43
Indirizzamento al nucleo	44
Metodologie per il trasferimento genico per la terapia genica: una visione d'insieme	45
Inoculazione diretta di DNA ed RNA	45
Metodi fisici	48
Elettroporazione	48
Iniezione idrodinamica intravascolare	48
Sonoporazione	49
Bombardamento con microparticelle ricoperte di DNA (<i>gene gun</i>)	49
Iniezione di DNA con getti ad alta pressione (<i>jet injection</i>)	50
Metodi chimici	50
Liposomi e lipidi cationici	50
Polimeri cationici	52
Proteine	54
Problematiche legate all'utilizzo dei metodi chimici per il trasferimento genico	56
Vettori virali	57
Vettori basati sui gammaretrovirus	58
Vettori basati sui lentivirus	75
Vettori basati sugli adenovirus	79
Vettori basati sul virus adeno-associato (AAV)	93
Vettori basati sul virus dell'herpes simplex (HSV)	102
Vettori virali per la terapia genica: campi di applicazione e valutazione comparativa	110
Letture consigliate	113
 Capitolo 4 – Sperimentazioni cliniche di terapia genica	 117
Sperimentazioni cliniche di terapia genica: considerazioni generali	117
Terapia genica delle cellule staminali ematopoietiche	121
Ematopoiesi e trapianto di cellule staminali ematopoietiche	122
Trasferimento genico nelle cellule staminali ematopoietiche	123
Applicazioni della terapia genica nelle cellule staminali ematopoietiche	124
Sperimentazioni cliniche di trasferimento genico nelle cellule staminali ematopoietiche: considerazioni generali	127

Terapia genica dell'ADA-SCID	131
Terapia genica della SCID-X1	133
Terapia genica della malattia granulomatosa cronica (CGD)	136
Terapia genica delle malattie da accumulo lisosomale	138
Terapia genica della fibrosi cistica	142
Terapia genica delle distrofie muscolari	144
Distrofina e proteine associate alla distrofina	144
Distrofie muscolari di Duchenne e di Becker	146
Terapia genica delle distrofie muscolari di Duchenne e di Becker	148
Terapia genica delle distrofie dei cingoli	153
Terapia genica dell'emofilia	153
Emofilie	154
Terapia genica dell'emofilia A e B	154
Terapia genica dei tumori	156
Inibizione della proliferazione o della sopravvivenza delle cellule tumorali	157
Terapia genica con geni suicidi	160
Virus oncolitici	162
Immunoterapia dei tumori	164
Vaccinazione antitumorale	166
Immunoterapia adottiva	172
Terapia genica delle malattie neurodegenerative	173
Terapia genica del morbo di Alzheimer	174
Terapia genica del morbo di Parkinson	175
Terapia genica del morbo di Huntington	180
Terapia genica della sclerosi laterale amiotrofica	182
Terapia genica delle malattie dell'occhio	184
Terapia genica delle degenerazioni congenite della retina ...	186
Terapia genica della neovascolarizzazione retinica	188
Terapia genica delle malattie cardiovascolari	190
Angiogenesi	191
Terapia genica per l'induzione di angiogenesi terapeutica ...	195
Scompenso cardiaco	198
Terapia genica dello scompenso cardiaco	202
Terapia genica dell'infezione da HIV/AIDS	203
Storia naturale dell'infezione da HIV-1 e terapia antiretrovirale	204
Terapia genica dell'infezione da HIV-1 mediante "immunizzazione intracellulare"	206
Terapia genica dell'infezione da HIV-1 mediante induzione della morte selettiva delle cellule infettate	209
Terapia genica per l'immunoterapia dell'infezione da HIV-1 .	209
Letture consigliate	211

Capitolo 5 – Problematiche etiche e sociali della terapia genica	217
Sicurezza delle sperimentazioni cliniche	217
Terapia genica delle cellule germinali	220
Terapia genica in utero	221
Terapia genica dell’embrione	222
Trasferimento genico per applicazioni cosmetiche e per il doping genetico	223
Letture consigliate	228
Indice analitico	231

Abbreviazioni

6-OHDA	6-idrossidopamina
α MHC	catena pesante dell' α -miosina
AADC	decarbossilasi degli L-amminoacidi aromatici
AAT	α 1-antitripsina
AAV	virus adeno-associato
AC	adenilato ciclasi
ACS	sindrome coronarica acuta
ACV	aciclovir
AD	morbo di Alzheimer
AIDS	sindrome da immunodeficienza acquisita
AFP	α -fetoproteina
ALS	sclerosi laterale amiotrofica
ALV	virus della leucosi aviaria
Ang1	angiopoietina 1
AMD	degenerazione maculare legata all'età
ApoB	apolipoproteina B
ApoE	apolipoproteina E
APC	cellula presentante l'antigene
APP	proteina precursore dell'amiloide
ART	artemina
ASO	oligonucleotide antisenso
β -AR	recettore β -adrenergico
β -ARK	chinasi del recettore β -adrenergico
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BFV	spumavirus bovino
BIV	virus dell'immunodeficienza bovina
BLV	virus della leucemia bovina
BMD	distrofia muscolare di Becker
BMT	trapianto di midollo osseo
BNA	<i>bridged nucleic acid</i>

CABG	<i>bypass</i> aorto-coronarico
CAD	malattia coronarica
CAEV	virus dell'artrite encefalite delle capre
CaMKII	<i>Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II</i>
CAR	recettore dei coxsackievirus/adenovirus
CCV	vescicola rivestita di clatrina
CD	citosina deaminasi
CDK	chinasi ciclina-dipendente
CDR	<i>complementarity-determining region</i>
CEA	antigene carcino-embrionario
CF	fibrosi cistica
CGD	malattia granulomatosa cronica
CLL	leucemia linfatica cronica
CLN2	ceroido-lipofuscinosi neuronale
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
CML	leucemia mieloide cronica
CMV	citomegalovirus
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
CNV	neovascolarizzazione della coroide
CT-1	cardiotrofina-1
CTA	<i>cancer-testis antigen</i>
CTE	<i>constitutive export element</i>
CTL	linfocita T citotossico
DBP	stimolazione cerebrale profonda
DC	cellula dendritica
DEAE-D	dietil-aminoetildestrano
DES	<i>stent</i> ad eluzione di farmaco
DGC	complesso di glicoproteine legate alla distrofina
DHFR	diidrofolato reductasi
DLB	demenza con corpi di Lewis
DMAEMA	2-(dimetil-amino)-etil metacrilato
DMD	distrofia muscolare di Duchenne
EBV	virus di Epstein-Barr
EEAT2	<i>excitatory amino acid transporter 2</i>
EEC	accoppiamento eccitazione-contrazione
EF	frazione di eiezione
EFV	spumavirus equino
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	recettore dell' <i>epidermal growth factor</i>
EIAV	virus dell'anemia infettiva equina
ENA	<i>ethylene-bridged nucleic acid</i>

EPO	eritropoietina
ER	reticolo endoplasmico
ERAD	degradazione delle proteine associata al reticolo endoplasmico
ERV	retrovirus endogeno
ES	embrionale staminale
ESE	<i>exon sequence enhancer</i>
FasL	ligando del recettore Fas
FeLV	virus della leucemia felina
FFV	spumavirus felino
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FGFR	recettore del <i>fibroblast growth factor</i>
FH	ipercolesterolemia familiare
FIV	virus dell'immunodeficienza felina
GAD	decarbossilasi dell'acido glutammico
GAG	glicosaminoglicani
GaLV	virus della leucemia del gibbono
GCV	ganciclovir
GDNF	<i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
GFP	proteina fluorescente verde
GGF	<i>glial growth factor</i>
GPCR	recettore accoppiato a proteina G
GRK2	chinasi 2 dei recettori accoppiati a proteina G
GST	glutathione S-trasferasi
GvHD	<i>graft-versus-host disease</i>
GvL	<i>graft-versus-leukemia</i>
GvT	<i>graft-versus-tumor</i>
HAART	<i>highly active antiretroviral therapy</i>
HAT	istone acetiltrasferasi
HD	morbo di Huntington
HFV	spumavirus umano
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HGFR	<i>hepatocyte growth factor receptor</i>
HHV	herpesvirus umano
HIV	virus dell'immunodeficienza umana
HPV	papillomavirus umano
HSC	cellula staminale ematopoietica
HSPGs	proteoglicani contenenti eparan-solfato
HSV	virus dell'herpes simplex
HSV-TK	timidino chinasi del virus dell'herpes simplex
HTLV	virus T-linfotropico umano

HVJ	<i>hemoagglutinating virus of Japan</i>
IAP	inibitore dell'apoptosi
IFN	interferone
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IL-6	interleuchina-6
IN	integrasi
IRES	internal ribosomal entry site
ITR	ripetizioni terminali invertite
L-DOPA	L-3,4-diidrossifenilalanina
LamR	recettore della laminina
LATs	trascritti associati alla latenza
LCA	amaurosi congenita di Leber
LDL	lipoproteine a bassa densità
LGMD	distrofia muscolare dei cingoli
LICLN	ceroido-lipofuscinosi neuronale
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
LMO2	<i>LIM domain only 2</i>
LNA	<i>locked nucleic acid</i>
LSDs	malattia lisosomale
LTR	ripetizioni terminali lunghe
M6PR/IGFIIr	recettore del mannosio-6-fosfato/IGF-II
MA	proteina della matrice
MAO	monoamino ossidasi
ManR	recettore del mannosio
MCK	creatin chinasi muscolare
MD	distrofia miotonica
MDGF	<i>megakaryocyte growth and development factor</i>
MHC	sistema maggiore di istocompatibilità
miRNA	microRNA
MLP	<i>major late promoter</i>
Mo-MLV	virus della leucemia murina di Moloney
Mo-MSV	virus del sarcoma murino di Moloney
MLV	virus della leucemia murina
MMA	metil metacrilato
MMP	metalloproteasi della matrice extracellulare
MMTV	virus del tumore mammario del topo
MPS	mucopolisaccaridosi
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
MSC	cellule mesenchimali staminali
MVB	corpi multivescicolari

MVM	<i>minute virus of mice</i>
NCL	ceroido-lipofuscinosi neuronale
NCX	scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$
NeuGC	acido N-glicolil neuramminico
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NIPA	poli(N-isopropilacrilammide)
NLS	segnale di localizzazione nucleare
NK	<i>natural killer</i>
NO	ossido nitrico
NSCLC	carcinoma del polmone non a piccole cellule
NT	neurotrofina
NTN	neurturina
OIR	retinopatia indotta dall'ossigeno
OTC	ornitina transcarbamilasi
PAD	arteriopatia periferica
PAGA	acido poli[α -(4-aminobutil)-L-glicolico
PBS	<i>primer binding site</i>
PCI	<i>percutaneous coronary intervention</i>
PD	morbo di Parkinson
PDE	fosfodiesterasi
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PEDF	<i>pigment epithelium-derived factor</i>
PEG	glicole polietilenico
PEI	polietilenimina
PIC	complesso di pre-integrazione
PLB	fosfolambano
PIGF	<i>placental growth factor</i>
PMO	morfolino
PNA	acido nucleico peptidico
Pol	polimerasi
POMC	pro-opiomelanocortina
PPT	tratto polipurinico
PSP	persefina
PTA	angioplastica percutanea transluminale
PTCA	angioplastica coronarica percutanea transluminale
PTGS	silenziamento genico post-trascrizionale
RBS	sito di legame per Rep
RCA	adenovirus competente per la replicazione
RCL	lentivirus competente per la replicazione

RCR	retrovirus competente per la replicazione
REV	virus della reticuloendoteliosi
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNAi	interferenza ad RNA
ROP	retinopatia del prematuro
RP	retinite pigmentosa
RPE	epitelio pigmentato della retina
RRE	<i>Rev responsive element</i>
RSV	virus del sarcoma di Rous
RT	trascrittasi inversa
SA	sito accettore di <i>splicing</i> (sito di <i>splicing</i> al 3')
SAP	<i>sphingolipid activator protein</i>
scAAV	<i>self complementary AAV</i>
SCF	<i>stem cell factor</i>
scFv	<i>single chain variable fragment</i>
SCID	sindrome da immunodeficienza severa combinata
SD	sito donatore di <i>splicing</i> (sito di <i>splicing</i> al 5')
SF	<i>scatter factor</i>
SFV	spumavirus della scimmia
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
SIN	auto-inattivante
SIV	virus dell'immunodeficienza della scimmia
SMA	atrofia muscolare spinale
SMC	cellula muscolare liscia
SOD	superossido dismutasi
SSV	virus del sarcoma della scimmia
TAA	antigene associato ai tumori
TAR	<i>transactivation response element</i>
TCR	recettore delle cellule T
TetR	repressore della tetraciclina
TFO	oligonucleotide formante una tripla elica
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
TGN	<i>trans-Golgi network</i>
TK	timidino chinasi
TIL	linfociti infiltranti i tumori
TLR	recettore <i>Toll-like</i>
TPO	trombopoietina
TSA	antigene specifico dei tumori
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TRS	<i>terminal resolution site</i>

USP	<i>ultraspiracle</i>
UTR	regione non tradotta
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	recettore del <i>vascular endothelial growth factor</i>
VSV	virus della stomatite vescicolare
VSV-G	proteina G del virus della stomatite vescicolare
VZV	virus della varicella-zoster
vWF	fattore di von Willebrandt
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis</i>

CAPITOLO 1

Introduzione alla terapia genica

Geni come farmaci

L'idea di poter utilizzare “i geni” come “farmaci” per la terapia delle malattie nasce verso la fine degli anni '70 negli Stati Uniti. È la logica conseguenza da un lato del progressivo aumento delle conoscenze sul funzionamento dei geni umani e sugli effetti delle loro mutazioni, e dall'altro dello sviluppo di metodi sempre più efficaci per il trasferimento del DNA all'interno nelle cellule, frutto dell'esplosione delle tecnologie dell'ingegneria genetica.

Le prime applicazioni originariamente intraviste per la terapia genica miravano alla correzione dei difetti dei pazienti affetti da malattie ereditarie monogeniche con ereditarietà recessiva. Queste malattie sono dovute alla mutazione di un singolo gene e si trasmettono, quindi, seguendo le leggi di Mendel; il termine *recessivo* indica che il fenotipo patologico si manifesta soltanto se entrambe le copie del gene interessato sono mutate. Esempi di tali malattie sono la fibrosi cistica, le distrofie muscolari, le malattie da accumulo lisosomale, l'emofilia e molte centinaia di altre. In queste malattie, la presenza di una copia normale del gene interessato è sufficiente per garantire uno stato di normalità: è questo, ad esempio, il caso dei genitori dei bambini con fibrosi cistica, o delle madri dei bambini maschi con distrofia muscolare o emofilia, due caratteri codificati dal cromosoma X. Nei pazienti affetti, quindi, l'inserzione di una copia normale del gene mediante terapia genica dovrebbe poter ripristinare la funzione mancante e quindi di curare la malattia.

Questi iniziali obiettivi della terapia genica illustrano una delle principali caratteristiche di questa modalità terapeutica, ovvero quella di basarsi su tecniche che consentano il trasferimento di copie aggiuntive di geni, e non direttamente sulla correzione delle mutazioni. Quest'ultima applicazione richiederebbe la sostituzione del segmento di DNA genomico che porta la mutazione con uno contenente la sequenza corretta, inserito nella cellula dall'esterno, sfruttando i meccanismi cellulari della ricombinazione omologa. Questa tecnica di fatto viene correntemente utilizzata nelle cellule embrionali staminali per la generazione di animali geneticamente modificati. Tuttavia, che un DNA esogeno inserito nella

cellula vada a sostituire una sequenza omologa di DNA genomico è un evento molto improbabile, che si verifica con una frequenza pari a circa l'uno per mille rispetto all'inserimento del DNA in posizioni casuali del genoma, un'evenienza che già di per sé è poco frequente. Ne consegue che la ricombinazione omologa può essere esclusivamente utilizzata in laboratorio, dove le poche cellule in cui l'evento di ricombinazione sia effettivamente avvenuto possono essere selezionate. Questa limitazione ne previene, al momento, un reale utilizzo terapeutico nei pazienti.

Nel 1980 una prima sperimentazione clinica di trasferimento genico fu praticata da un genetista ematologo statunitense, Martin Cline, in modo surrettizio, su due bambini talassemici, senza peraltro ottenere alcun effetto terapeutico. Questa sperimentazione fu aspramente criticata dal punto di vista scientifico ed etico, in quanto non basata su presupposti sperimentali solidi. Inoltre, per aggirare un divieto delle autorità competenti degli Stati Uniti, la sperimentazione fu eseguita su un paziente in Israele e uno in Italia, paesi in cui al tempo non esisteva una normativa specifica nel settore.

La prima sperimentazione di terapia genica scientificamente ed eticamente fondata fu approvata negli Stati Uniti nell'ottobre del 1988 e iniziò nei primi mesi del 1989 a Bethesda, vicino a Washington. Si trattava in realtà di una sperimentazione di marcatura genetica, senza vero scopo terapeutico. Venne compiuta dall'oncologo Steven Rosenberg, ed aveva come obiettivo quello di marcare geneticamente *ex vivo* alcune cellule prelevate dai pazienti, in modo da poter seguire il loro destino una volta re-iniettate negli stessi. Si trattava dei linfociti T prelevati dai tumori (*tumor infiltrating lymphocytes*, TIL) di 5 pazienti con melanoma in fase terminale; la trasduzione di queste cellule *ex vivo* con un vettore retrovirale in grado di trasferire un gene marcatore aveva quindi lo scopo di renderle distinguibili una volta reinfuse. Dei TIL contenenti il provirus furono effettivamente trovati, in tutti i pazienti trattati, nel sangue periferico 3 settimane dopo l'infusione e nelle biopsie tumorali per almeno 2 mesi, dimostrando così sia l'efficacia del trasferimento genico *ex vivo* sia le proprietà dei TIL di mantenere la capacità di riconoscere ed infiltrare i tumori anche dopo essere stati coltivati ed espansi in laboratorio.

Nel 1990, sempre a Bethesda, fu anche eseguita la prima sperimentazione di terapia genica con finalità terapeutiche vere e proprie. Fu condotta da Michael Bleas e French Anderson in 2 bambini affetti da deficit di adenosina deaminasi (ADA), un difetto ereditario che porta a una grave forma di immunodeficienza primitiva. Anche in questa sperimentazione il trasferimento genico venne praticato *ex vivo*, sui linfociti T prelevati dal sangue periferico dei pazienti ed espansi in laboratorio; le cellule trasdotte furono quindi reinfuse nei pazienti. Il gene che codifica per l'ADA era stato veicolato all'interno dei linfociti mediante un vettore retrovirale. Nonostante l'apparente miglioramento dello stato di salute dei pazienti, la reale efficacia di questa prima sperimentazione rimase controversa, in quanto i pazienti trattati avevano continuato anche ad assumere l'enzima ADA sotto forma di proteina ricombinante.

Già in queste prime fasi di sviluppo della terapia genica, la comunità scientifica

aveva intuito che le medesime tecnologie che servivano a trasferire geni le cui mutazioni erano responsabili delle malattie ereditarie monogeniche potevano in realtà essere utilizzate anche per trasferire geni responsabili di altre funzioni, per modificare o modulare gli aspetti più vari delle attività delle cellule. Inoltre, si era anche compreso che non necessariamente gli acidi nucleici utilizzati dalla terapia genica dovevano codificare una proteina, ma potevano essere costituiti da qualsiasi frammento di DNA o RNA con funzione regolatoria. Questa accezione allargata della terapia genica ha consentito il suo enorme sviluppo, soprattutto dovuto alle innovative potenzialità terapeutiche che questa tecnologia offre per affrontare malattie molto diffuse nella popolazione e spesso non curabili con le terapie tradizionali. A questo proposito va infatti ricordato che, nonostante il numero delle malattie note che presentano ereditarietà di tipo mendeliano e fenotipo recessivo sia di alcune migliaia (consultabili *on line* sul sito web della banca dati OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>), esse rappresentano meno del 30% del totale delle malattie ereditarie monogeniche; ben più importante, queste malattie complessivamente colpiscono meno del 2% degli individui della popolazione generale. Nei Paesi industrializzati, infatti, le maggiori cause di mortalità e morbilità sono dovute alle malattie cardiovascolari, ai tumori, alle malattie degenerative del sistema nervoso centrale. La possibilità di affrontare queste malattie con la terapia genica ha quindi decretato, nella prima metà degli anni '90, il grande interesse scientifico ed economico che ha portato allo sviluppo di questa disciplina.

Parallelamente all'allargamento delle possibilità terapeutiche della terapia genica, a partire dalla fine degli anni '90 si è cominciato a prendere coscienza dell'esistenza di serie difficoltà tecniche e concettuali che rendevano (e rendono tuttora) problematica l'applicazione clinica su vasta scala di questa modalità terapeutica. L'entusiasmo iniziale è stato prima stemperato da una serie di problemi tecnici legati prevalentemente all'efficienza del trasferimento genico, uno dei principali ostacoli al successo terapeutico, ed è poi stato sostituito da un diffuso scetticismo, soprattutto a causa di alcuni eventi avversi accaduti in un paio di sperimentazioni cliniche. In particolare, nel 1999 a Filadelfia, un paziente con deficit di ornitina-transcarbamilasi è morto nel corso di una sperimentazione che faceva uso di un vettore adenovirale iniettato nel fegato; più recentemente, alcuni bambini con una forma severa di immunodeficienza combinata, apparentemente guariti grazie all'utilizzo di un vettore retrovirale nelle cellule ematopoietiche staminali, hanno poi sviluppato una rara forma di leucemia in due sperimentazioni, una a Parigi e l'altra a Londra. Questi episodi hanno dimostrato in maniera eclatante quante siano ancora le difficoltà da superare prima che la terapia genica diventi di larga diffusione e quanto l'esito delle sperimentazioni possa talvolta essere imprevedibile, malgrado la cautela e il rispetto delle normative etiche con cui esse vengono oggi eseguite.

Nonostante queste difficoltà, la terapia genica è progredita in altri settori. In particolare, negli ultimi 5 anni è salita alla ribalta l'efficacia dei vettori virali basati sul virus adeno-associato (AAV), che hanno portato, nel 2008, al successo terapeutico in una forma di cecità congenita, l'amaurosi congenita di Leber,

e che stanno offrendo molte speranze nelle sperimentazioni per il morbo di Parkinson e il morbo di Alzheimer.

Nel valutare nel loro complesso i risultati oggettivamente conseguiti dalla terapia genica dal 1989 a oggi, superficialmente può sembrare che il progresso sia stato lento. A tuttora, la terapia genica rimane una disciplina molto giovane, con obiettivi e strumenti di azione non convenzionali ed estremamente innovativi, tali quindi da richiedere ulteriori tempi di sviluppo, molto più lunghi di quelli dei farmaci convenzionali. Tuttavia, per molte malattie, la terapia genica continua di fatto a rappresentare l'unica speranza possibile di guarigione. A questo proposito, è bene ricordare che sono ormai passati molti anni dalla clonazione dei geni responsabili di diverse patologie ereditarie umane, senza che questa informazione abbia di fatto generato alcun vantaggio in termini di terapie convenzionali per i pazienti (ad esempio, il gene per la fibrosi cistica è stato clonato nel 1987, quello dei fattori IX e VIII della coagulazione, responsabili dell'emofilia A e B, rispettivamente, nel 1982 e 1984). Nonostante sia necessario molto tempo perché l'informazione genetica si possa tradurre in un'opportunità terapeutica, questo non deve scoraggiare l'impegno costante a generare miglioramenti spesso piccoli ma incrementali, che alla fine si tradurranno nella guarigione o in un miglioramento significativo delle condizioni dei pazienti. Analoghe situazioni di fatto sono già state vissute da altre modalità terapeutiche innovative. Ad esempio, la chemioterapia antineoplastica fu originariamente proposta nei bambini con leucemia linfatica acuta già negli anni '60, ma sono stati necessari altri 40 anni perché la percentuale di guarigione salisse dal 5-10%, come era all'origine, all'80-90% di adesso. Analogamente, il primo trapianto di midollo osseo per la terapia delle neoplasie ematologiche risale al 1957 ma il primo successo fu riportato soltanto nel 1970, e ci sono voluti molti anni per trasformare il trapianto di midollo nella modalità terapeutica che conosciamo oggi, efficace in una vasta serie di malattie ematologiche quali le aplasie midollari, le immunodeficienze e varie malattie neoplastiche del sangue.

Terapia genica: una visione d'insieme

Lo sviluppo di qualsiasi approccio di terapia genica richiede un'accurata valutazione di una serie di parametri, che includono l'individuazione di una patologia che realisticamente possa trarre vantaggio dal trasferimento genico, la scelta del gene terapeutico adeguato, la scelta di segnali regolativi da associare ad esso nel caso debba essere espresso *in vivo*, l'utilizzo di un sistema di trasferimento genico appropriato e la scelta della via di somministrazione e della posologia adeguate.

Scelta del gene terapeutico

Come accennato sopra, oggi a disposizione della terapia genica esiste un vasto spettro di potenziali geni terapeutici, intendendo con questo termine sequenze di

acidi nucleici (DNA o RNA) di diversa lunghezza o composizione chimica. Queste sequenze comprendono geni veri e propri, che codificano proteine (o i rispettivi cDNA) e una estesa serie di piccoli acidi nucleici non codificanti, tra cui: oligonucleotidi di DNA modificato chimicamente, solitamente utilizzati con funzione antisense; ribozimi e siRNA, in grado di riconoscere un RNA bersaglio e determinarne la distruzione; RNA con funzione di *decoy*, in grado di legare una proteina patologica e sottrarla alla sua funzione; e, infine, RNA con funzione di aptameri, ovvero in grado di legarsi ad altre macromolecole in virtù della propria conformazione tridimensionale. La scelta del gene terapeutico appropriato per la patologia che si intende trattare è ovviamente decisiva per il successo di qualsiasi protocollo di terapia genica; le proprietà dei diversi acidi nucleici per la terapia genica sono presentate e discusse nel Capitolo 2 sugli Acidi nucleici con funzione terapeutica.

Modalità di somministrazione dei geni terapeutici

In generale, la terapia genica può essere eseguita con due tipi di approccio terapeutico, rappresentati dal trasferimento di acidi nucleici *ex vivo* o *in vivo*. Nella terapia genica *ex vivo*, le cellule del paziente sono isolate e coltivate in laboratorio. Durante questo periodo, il gene terapeutico è trasferito nelle cellule che sono infine reinserite nello stesso paziente da cui erano state prelevate. Il vantaggio di questo approccio è rappresentato dalla ridotta probabilità di indurre una risposta immune contro il vettore necessario per veicolare il gene. Tuttavia, la procedura è più laboriosa e costosa del trasferimento diretto *in vivo*, anche perché va personalizzata per ogni paziente. Lo spettro dei tipi cellulari che possono essere mantenuti ed espansi *ex vivo* si è allargato negli ultimi anni, e comprende, oltre ai linfociti e alle cellule staminali ematopoietiche, anche una serie di cellule con fenotipo staminale e con capacità di dare origine a tipi cellulari diversi, tra cui le cellule dell'epidermide, i precursori delle cellule endoteliali dei vasi, i progenitori delle cellule muscolari, gli epatociti. La possibilità di trasferimento genico in queste cellule offre importanti possibilità terapeutiche in cui la terapia genica si affianca alla terapia cellulare, e comprende il trattamento di alcune malattie ereditarie (ad esempio, le distrofie muscolari, alcune malattie ereditarie del fegato) o degenerative (ad esempio, il morbo di Parkinson o l'infarto del miocardio).

Nella terapia genica *in vivo*, il gene terapeutico è invece inserito direttamente nelle cellule del paziente all'interno dell'organismo. In linea di principio, questo approccio è più semplice e una volta ottimizzato, può essere applicato a un numero illimitato di pazienti che presentino la stessa patologia. Vanno tuttavia tenute presenti le seguenti considerazioni. 1) *in vivo* molti tessuti sono difficili da raggiungere o da trasdurre in maniera quantitativamente significativa. Ad esempio, è difficile pensare a una terapia genica estesa nel tessuto nervoso, nella cartilagine, nel tessuto connettivo; in questi casi, la terapia genica è necessariamente limitata alla somministrazione del gene terapeutico in distretti

specifici (ad esempio, nelle articolazioni, o in regioni localizzate del cervello). 2) è difficile evitare di trasferire il gene terapeutico in tipi cellulari diversi dalla cellula bersaglio, dove la sua espressione potrebbe essere dannosa o comunque non desiderata. 3) il vettore per il trasferimento del gene terapeutico, quando somministrato direttamente *in vivo*, è soggetto alla possibilità di inattivazione (da parte del complemento, come nel caso dei vettori oncoretrovirali, o da parte di anticorpi specifici neutralizzanti) e comunque stimola una risposta immunitaria del paziente (vedi anche sotto). 4) la maggior parte delle cellule del nostro organismo (tra cui le cellule del muscolo, del cervello, dell'endotelio vascolare, del fegato) sono in uno stato di quiescenza replicativa. Questo limita l'applicazione di vettori, quali i vettori oncoretrovirali, che necessitano che la cellula bersaglio sia in fase di attiva replicazione.

Sistemi di trasferimento genico

Probabilmente il fattore fondamentale che determina il successo di ogni approccio di terapia genica è l'efficienza con cui gli acidi nucleici con funzione terapeutica vengono effettivamente internalizzati dalle cellule bersaglio. La membrana plasmatica idrofobica delle cellule di mammifero rappresenta una barriera difficilmente superabile da grandi molecole anioniche quali il DNA e l'RNA. Salvo poche eccezioni, quindi, gli acidi nucleici nudi sono in grado di penetrare nelle cellule con scarsa efficienza. Il trasferimento genico può però essere stimolato utilizzando una serie di metodi fisici (ad esempio, l'elettroporazione o l'iniezione del DNA ad alta pressione) o chimici (tipicamente utilizzando lipidi o polimeri cationici), oppure modificando l'informazione genetica di alcuni virus e utilizzando le particelle virali come vettori. Nel caso del DNA nudo o dell'utilizzo di metodi non virali, il processo di trasferimento genico prende il nome generico di *trasfezione*; quando vengono invece utilizzati virus modificati si parla di *trasduzione*. Almeno quattro diverse famiglie di virus sono attualmente considerate nelle sperimentazioni cliniche: quelle basate sui retrovirus (oncoretrovirus e lentivirus), gli adenovirus, il virus adeno-associato (AAV) e gli herpesvirus. I principali metodi di trasferimento genico saranno descritti nel Capitolo 3 sulle Metodologie per il trasferimento genico.

Targeting cellulare

Nella terapia genica *in vivo*, sarebbe importante che il gene terapeutico venisse internalizzato esclusivamente dal tipo cellulare desiderato. Questa esigenza di fatto riprende quella delineata dallo scienziato e medico tedesco Paul Ehrlich, vincitore del premio Nobel per la Fisiologia e Medicina nel 1908, che con il concetto di "pallottola magica" (*magic bullet*) voleva indicare un farmaco ideale in grado di essere iniettato e capace di agire in maniera selettiva su uno specifico bersaglio (nel caso di Ehrlich, si trattava soprattutto di colpire un determinato microrganismo).

Attualmente, siamo purtroppo ancora distanti dall'aver raggiunto l'obiettivo di generare sistemi altamente selettivi per veicolazione dei geni. Possono però essere utilizzati proteine o anticorpi monoclonali - questi ultimi di fatto incarnano in chiave moderna il concetto di *magic bullet* di Ehrlich - che riconoscono determinati recettori cellulari, come ad esempio, il recettore c-ErbB2 per la terapia genica del carcinoma mammario, o il recettore per le asialoglicoproteine, per la terapia genica delle malattie epatiche. L'incorporazione di siffatti ligandi specifici nei complessi di lipidi cationici/DNA (nel caso della trasfezione con sistemi non virali) o la loro coniugazione sulla superficie dei vettori virali (nel caso della trasduzione con vettori virali) può consentire l'indirizzamento specifico del gene terapeutico in una determinata cellula bersaglio. Alternativamente, il capsido dei vettori virali stessi può essere modificato in modo da contenere regioni corrispondenti ai ligandi desiderati, un obiettivo variamente perseguito sia nel caso dei vettori adenovirali che di quelli AAV. A questo proposito, è importante tuttavia sottolineare che l'efficienza di queste strategie è ancora molto modesta, soprattutto perché le procedure di *targeting* che prevedono la modificazione delle particelle virali solitamente si associano a una drastica perdita dell'infettività dei vettori.

Un'altra maniera per ottenere *targeting* cellulare, quando si voglia esprimere un gene soltanto in un determinato tessuto, è quello di agire a livello trascrizionale, ovvero utilizzando dei promotori attivi soltanto nelle cellule desiderate. Indipendentemente dalle cellule in cui il gene terapeutico sarà in grado di entrare, esso verrà trascritto soltanto nel tipo cellulare in cui il promotore che ne dirige l'espressione è attivo.

Persistenza del gene terapeutico

Un parametro molto importante da considerare nell'allestimento di una sperimentazione di terapia genica è ovviamente legato alla persistenza del trasferimento genico. Questa è prevalentemente legata alle caratteristiche dell'acido nucleico terapeutico e alle modalità di trasferimento genico. Nel caso il gene terapeutico sia un piccolo RNA o DNA regolatorio (oligonucleotidi antisense, aptameri, ribozimi, siRNA) diventa fondamentale che esso venga veicolato *in vivo* con la massima efficienza possibile (ad esempio, complessando l'acido nucleico con lipidi o polimeri cationici), che esso sia protetto il più a lungo possibile dalla degradazione e che non venga rapidamente eliminato dalla circolazione da parte del fegato, del rene o del sistema reticolo-endoteliale.

Nel caso dei vettori virali, quelli basati sugli oncoretrovirus e sui lentivirus integrano il proprio genoma a quello della cellula infettata e quindi danno luogo a una trasduzione permanente. Sono quindi i vettori di scelta per la terapia delle malattie ereditarie monogeniche o per il trasferimento genico in popolazioni di cellule staminali, che successivamente vanno incontro a espansione *in vitro* o *in vivo*. In diversi tipi cellulari, tuttavia, l'espressione genica a partire dai vettori retrovirali nel tempo va incontro a progressiva riduzione. Questo, ad esempio, è