

La terapia genica

Per terapia genica si intende l'utilizzo di acidi nucleici come farmaci. Gli acidi nucleici possono essere introdotti in cellule germinali o, più comunemente, in cellule somatiche (rispettivamente trasferimento genico germinale o somatico). In cellule somatiche poi il trasferimento genico può essere effettuato in un tessuto appartenente ad un organismo *in vivo* o in cellule espianate *ex vivo*. Il trasferimento di acidi nucleici può essere effettuato o con vettori derivati da virus o mediante metodiche non virali. Ciascuna di queste metodiche presenta vantaggi e svantaggi, sebbene oggi, per la maggior parte delle applicazioni il trasferimento mediante vettori virali risulta più efficiente. La capacità di un vettore virale o non virale di entrare in una cellula e determinare un effetto biologico (in generale l'espressione di un gene esogeno) è detto trasduzione. Al giorno d'oggi nessun prodotto di terapia genica è ancora entrato in commercio ma innumerevoli sperimentazioni sull'uomo sono in corso con risultati promettenti. Questo capitolo ha lo scopo di discutere i sistemi vettoriali più utilizzati e la loro sperimentazione nell'uomo.

Cos'è la terapia genica

La terapia genica è una forma innovativa di terapia che nasce dalla consapevolezza che la causa della malattia è un difetto nei geni presenti nelle nostre cellule. Questo vale soprattutto per le malattie genetiche, ma anche per molte altre. Nel caso particolare delle malattie genetiche, il difetto è acquisito alla nascita ed è presente in tutte le cellule. Quel difetto può causare molti sintomi, talvolta devastanti, che si originano tutti a partire da una singola ragione. Con l'ingegneria genetica è possibile manipolare i geni e costruire in laboratorio un gene funzionale che corregga quel difetto. La difficoltà di un simile approccio terapeutico è inserire questo gene nelle cellule del malato.

Due principali metodi possono essere utilizzati per il trasferimento di geni: *ex vivo* e *in vivo*. Nel trasferimento *ex vivo* si trasferiscono geni clonati in cellule autologhe, ovvero dello stesso individuo, per evitare che esse vengano rigettate dal sistema immunitario del paziente trattato. In particolare le cellule vengono espianate, selezionate per l'espressione del gene inserito, amplificate ed infine reintrodotte nel paziente. Questo metodo è applicabile ai soli tessuti che possono essere prelevati dal corpo, modificati geneticamente e reintrodotti nel paziente, dove attecchiscono e sopravvivono per un lungo periodo di tempo, come ad esempio le cellule del sistema ematopoietico e della pelle. Tale procedura è sicuramente lunga e costosa ma permette di selezionare ed amplificare le cellule d'interesse e gode di una elevata efficienza. La terapia genica *in vivo* viene attuata in tutti quei casi in cui le cellule non possono essere messe in coltura o prelevate e reimpiantate, come quelle del cervello o del cuore e della maggior parte degli organi interni. Inoltre, rappresenta un modello terapeutico con elevata *compliance* e più economico del precedente ma, attualmente, di più difficile applicazione. In questo caso il gene d'interesse viene inserito nell'organismo, tramite un opportuno vettore, direttamente per via locale o sistemica.

Generalmente, per ottenere buoni risultati, si utilizzano vettori virali, cioè virus ingegnerizzati in modo da fargli trasportare il gene terapeutico e inserirlo nelle cellule bersaglio. Praticamente il virus viene privato del proprio genoma e quindi reso innocuo, ma conserva la sua capacità di "infettare" le cellule. In questo modo agisce come una specie di "Cavallo di Troia" che trasferisce nelle cellule il gene terapeutico, si esaurisce una volta terminato questo passaggio, e ciò che resta è la correzione del difetto.

Il maggiore ostacolo per il successo della terapia genica è rappresentato dalla difficoltà di trovare un sistema virale che raggiunga un livello di efficienza sufficiente nell'infettare tutte le cellule bersaglio. Un altro punto critico nasce dal fatto che il virus ingegnerizzato potrebbe essere

riconosciuto come corpo estraneo dall'organismo e suscitare quindi una reazione immunitaria. Un terzo problema da risolvere è di rendere l'espressione del gene terapeutico persistente nel tempo senza bisogno di doversi sottoporre a continui trattamenti. Un altro possibile rischio è che il virus dia origine a particelle capaci di riprodursi in modo incontrollato e che trasporti all'interno della cellula anche dei componenti tossici (come le proteine del capsido).

Esistono anche vettori non virali per effettuare il trasferimento del gene terapeutico all'interno della cellula bersaglio. Di solito sono formati da nanoparticelle cariche positivamente che formano interazioni elettrostatiche con il DNA carico negativamente. Rispetto ai vettori virali, però, hanno un'efficienza nettamente minore.

Vettori per la terapia genica

La parte decisiva della terapia genica consiste nel metodo da adottare per effettuare il trasferimento del gene terapeutico (trasfezione). Questa tecnica si basa sull'utilizzo di vettori che veicolino il materiale genetico all'interno delle cellule. Vengono attualmente distinti in virali e non virali.

I vettori virali

Si ottengono inserendo il gene di interesse nel genoma di diversi tipi di virus, sotto il controllo di un promotore forte. Il virus viene reso difettivo, cioè incapace di riprodursi autonomamente per evitare la diffusione di virus ricombinanti. Il genoma viene ingegnerizzato con le tecniche del DNA ricombinante, e trasfettato in particolari linee cellulari capaci di produrre le particelle virali ricombinanti (linee di packaging). Queste complementano i difetti introdotti nel genoma.

In linea di massima, il principale vantaggio dei vettori virali consiste nell'elevata efficienza di trasduzione (fino al 100% delle cellule). Gli svantaggi invece risiedono nella possibilità di generare nuovi virus patogeni per ricombinazione con eventuali virus presenti nell'ospite, nel rischio di mutagenesi inserzionale (per quelli che si integrano in maniera casuale nel genoma) e nell'insorgenza di reazioni immunitarie. Possono poi trasportare generalmente molecole di DNA di dimensioni limitate. Un altro problema sono i costi elevati.

I virus attualmente studiati quali vettori per la terapia genica sono: i retrovirus; i lentivirus; gli adenovirus; i virus adenoassociati; gli herpes simplex virus. Ognuno di questi vettori presenta vantaggi e svantaggi.

Retrovirus

I retrovirus sono stati i primi virus ad essere studiati nella terapia genica, il loro genoma è costituito da un singolo filamento di RNA delle dimensioni di circa 10kb, contenente 3 geni essenziali: *gag* (codifica per le proteine del core), *pol* (codifica per la trascrittasi inversa) ed *env* (codifica per le proteine del capsido). A questi si aggiunge una regione *y* per l'impacchettamento. A ciascuna estremità vi sono le LTR (long terminal repeats) con sequenze implicate nell'integrazione e regioni promotore ed enhancer. Una volta infettata la cellula, attraverso un processo di trascrizione inversa si forma il doppio filamento di DNA che si integra nel genoma della cellula ospite esprimendo così le proteine virali. I retrovirus comunemente usati derivano dal virus della leucemia murina (Mo MLV) che deve essere però opportunamente modificato: i 3 geni essenziali vengono sostituiti col gene di interesse mentre vengono mantenute le sequenze regolatrici; possono essere aggiunti geni marcatori (NEO) e promotori alternativi di origine virale (CMV) o cellulare (beta actina, tirosina).

Vantaggi:

- Non provocano malattie umane.
- Inducono scarsa risposta immunitaria nell'ospite.
- I transgeni possono essere espressi per tutta la vita dell'ospite.
- Capacità di infettare efficientemente una vasta gamma di tipi cellulari.
- Integrazione del materiale genetico recato dal vettore nel genoma delle cellule bersaglio.
- Alta efficienza di trasduzione.

Svantaggi:

- Potenziale oncogeno perché si integrano nel genoma dell'ospite in molteplici siti.
- Possono subire inattivazione trascrizionale in vivo.
- Infettano solo cellule in attiva divisione.
- Sono difficili da coltivare.
- Basso titolo.

Lentivirus

I lentivirus appartengono alla famiglia dei retrovirus di cui condividono la morfologia ed il ciclo replicativo ma, a differenza dei precedenti, possono infettare anche cellule non replicanti, il che li rende dei buoni candidati per modificare l'espressione delle cellule a differenziazione terminale, come quelle del cuore o del sistema nervoso centrale. Oggi vengono utilizzati lentivirus derivati dal virus HIV opportunamente modificati per garantire la sicurezza del ricevente.

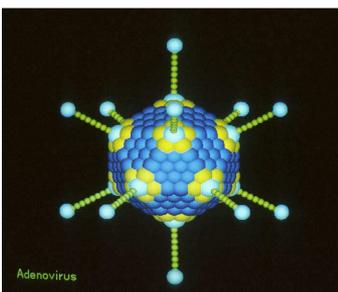
Vantaggi:

- Possono essere somministrati in vivo.
- Non sono inattivati dal complemento.
- Infettano sia cellule in divisione che quiescenti.
- I transgeni possono essere espressi per tutta la vita dell'ospite.
- Integrazione del materiale genetico recato dal vettore nel genoma delle cellule bersaglio.

Svantaggi:

- Potenziale oncogeno perché si integrano nel genoma dell'ospite in molteplici siti.
- Possono provocare malattia nell'uomo.
- Sono difficili da coltivare.

Adenovirus



Gli adenovirus, che nell'uomo provocano infezioni del tratto respiratorio, presentano un genoma costituito da un doppio filamento di DNA di circa 35 kb, 30 dei quali possono essere rimpiazzati col gene di interesse. Una volta all'interno della cellula, l'adenovirus non si integra nel genoma ma si replica nel nucleo come un episoma.

Vantaggi:

- Sicuri (non integrano nel genoma).
- Facilmente manipolabili.
- Stabili.
- Si ottengono alti titoli.
- Ampio tropismo.
- Infettano anche cellule quiescenti.
- Possono veicolare inserti di grosse dimensioni (36Kb).

Svantaggi:

- Espressione transiente.
- Alta risposta immunitaria.

Virus adenoassociati

I virus adenoassociati appartengono alla famiglia dei parvovirus, piccoli virus non patogeni per l'uomo, hanno un genoma formato da una molecola di DNA a singolo filamento di circa 5 kb e possono infettare cellule proliferanti e non. Per replicarsi autonomamente necessitano però di un altro virus che in genere è un adenovirus o un herpesvirus.

Vantaggi:

- Non sono patogeni per l'uomo.
- Sono stabili.
- Vengono ottenuti con alti titoli.
- Alta efficienza di trasferimento genico.
- Ampio tropismo.
- Infettano sia cellule in divisione che non.
- Integrazione del transgene.

Svantaggi:

- Dimensioni ridotte del transgene (4.7 Kb). Recentemente la capacità di questi vettori è stata aumentata sfruttando concatamerizzazione del genoma dei AAV dopo il traferimento. Si usano due vettori, ciascuno codificante metà della proteina di interesse.
- Vettore ricombinante non ha integrazione sito specifica e talvolta resta episomale.

Herpes simplex virus



Gli herpes simplex virus, grazie alla loro naturale capacità di stabilire infezioni latenti nei neuroni, vengono utilizzati per il trasporto di geni nel CNS. L'espressione a lungo termine del transgene viene ottenuta utilizzando dei promotori neurone-specifici, attivati durante il periodo di latenza. Il genoma degli herpes virus è costituito da un doppio filamento di DNA di 152kb, contiene più di 80 geni, la metà dei quali non risulta essenziale per la crescita in cellule di coltura; una volta eliminati tali geni è possibile inserire un transgene di grosse dimensioni (circa 40-50kb).

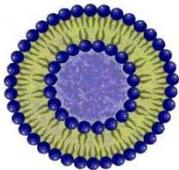
I vettori non virali

Le metodologie adottate per trasferire il DNA senza ricorrere a virus comprendono: l'iniezione di DNA nudo; l'inserimento tramite liposomi; l'inserimento attraverso l'uso di polimeri cationici; il bombardamento tramite particelle (gene gun).

DNA nudo

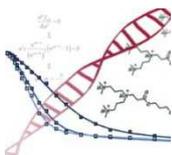
L'inserzione di DNA nudo è la procedura più lineare e più semplice ed inoltre permette di trasferire costrutti genici di grandi dimensioni. Consiste nell'iniettare il gene terapeutico, legato ad un plasmide, direttamente nella cellula tramite l'utilizzo d'una micropipetta. Lo svantaggio di questa metodica consiste nel fatto che bisogna iniettare il DNA in ogni cellula, una per una. Il rendimento, inoltre, è decisamente basso.

Liposomi



I liposomi sono vescicole sferiche la cui parete è composta da un doppio strato fosfolipidico. Usando liposomi cationici è possibile far complessare ad essi il DNA, che a pH neutro presenta carica negativa. Il complesso DNA-liposoma può fondersi con la membrana cellulare ma nella maggior parte dei casi viene internalizzato tramite endocitosi. Successivamente il DNA viene liberato nel citoplasma, entra nel nucleo e viene espresso. Sfortunatamente questo processo è a bassa efficienza in quanto si è visto che solo lo 0,1% del DNA introdotto viene espresso. Per ovviare a ciò nei liposomi sono state anche inserite proteine ed anticorpi che possano aumentare l'efficacia della procedura minimizzando la degradazione del DNA e facilitando il corretto direzionamento della vescicola.

Polimeri cationici



Molto simile è la procedura di trasfezione che utilizza polimeri cationici, infatti macromolecole dotate di molteplici cariche positive possono interagire con il DNA, il quale a pH fisiologico è un polianione, provocandone la condensazione e proteggendolo da aggressivi sia chimici che

enzimatici, oltre che da radiazioni ionizzanti. Anche i complessi DNA-polimerasi vengono internalizzati dalla cellula per endocitosi, e possono essere attivamente indirizzati verso specifiche linee cellulari o tessuti utilizzando anticorpi o altre molecole direzionanti.

Bombardamento tramite particelle (gene gun)



Il bombardamento tramite particelle consiste nell'utilizzo di particolari strumenti elettrici o ad alta pressione, dette pistole geniche (gene gun), che permettono di inviare nella cellula particelle microscopiche d'oro o di tungsteno ricoperte di DNA. Al momento non esistono studi sull'uomo di questa metodica ma solo su animali.

Quali malattie possono essere trattate con la terapia genica?

In linea teorica, tutte le malattie possono essere trattate attraverso interventi sull'espressione genica. Comunemente, si pensa che la terapia genica sia utile per guarire malattie ereditarie quali:

- distrofia muscolare
- fibrosi cistica
- emofilia
- diabete di tipo I
- malattie metaboliche (fenilchetonuria)
- anomalie fisiologiche (mucopolisaccaridosi, sindrome di Gaucher etc.)

In realtà con questa terapia possono essere trattate anche malattie che colpiscono chi è geneticamente predisposto, ma che dipendono fortemente da fattori ambientali, come :

- cancro
- malattie cardiovascolari
- malattie neurodegenerative (morbo di Alzheimer, morbo di Parkinson etc.)

Infine la terapia genica può trattare anche malattie acquisite quali:

- Traumi di vario tipo (fratture ossee, ferite, ustioni)
- Ischemie (necrosi dei tessuti causate da un'interruzione dell'apporto sanguigno)
- Infezioni