

# ***Farmacologia cellulare e molecolare***

***Prof.ssa Patrizia Romualdi, PhD***

## Nei casi di malattie genetiche

- \* presidi farmacologici carenti
- \* trapianti d'organo difficoltosi

- Terapia genica
- Vettori e modalità di trasferimento genico
- Tecnologia del DNA ricombinante

# Terapia genica

si intende l'inserzione di materiale genetico (DNA) all'interno delle cellule al fine di poter curare delle patologie → TRASFEZIONE

→ la **TERAPIA GENICA** mira a correggere le cause molecolari delle patologie mediante la sostituzione o l'aggiunta di un'informazione genetica “CORRETTA” nelle cellule del tessuto affetto.

*considerazioni bioetiche*

**Inizio terapia genica anni '90 (1° trial clinico di trasferimento genico in cellule somatiche umane '89/'90 in USA, nel '92 in Italia)**

# APPROCCIO

1<sup>^</sup> → è necessario in primo luogo identificare il singolo gene o i diversi geni responsabili della malattia genetica.

2<sup>^</sup> → si può tentare in secondo luogo - almeno per alcune malattie - la sostituzione dei geni malati sfruttando un virus reso inattivo (svuotato preventivamente del suo corredo genetico) **CHE FUNGE DA VETTORE .**



Si può poi 'correggere' il DNA, rimpiazzando le sequenze difettose tramite l'uso di enzimi di restrizione che sono come "forbici" molecolari enzimatiche, (con cui si preleva il gene "sano") in modo tale che la cellula sintetizzi correttamente le proteine necessarie al corretto funzionamento metabolico.

**ALTRO POSSIBILE APPROCCIO:** in cui non si va a sostituire un gene difettoso ma se ne **aggiunge uno che possa mettere in moto un fenomeno terapeuticamente utile.**

→ TRASFEZIONE delle cellule somatiche di un individuo avente una malattia genetica con un segmento di DNA contenente l'allele sano.

## Le terapie geniche CAR-T

Le “CAR-T” (acronimo dall’inglese “Chimeric Antigen Receptor T cell therapies” ovvero “Terapie a base di cellule T esprimenti un Recettore Chimerico per antigene”) sono nuove terapie personalizzate contro il cancro che agiscono direttamente sul sistema immunitario del paziente per renderlo in grado di riconoscere e distruggere le cellule tumorali (immunoterapie).

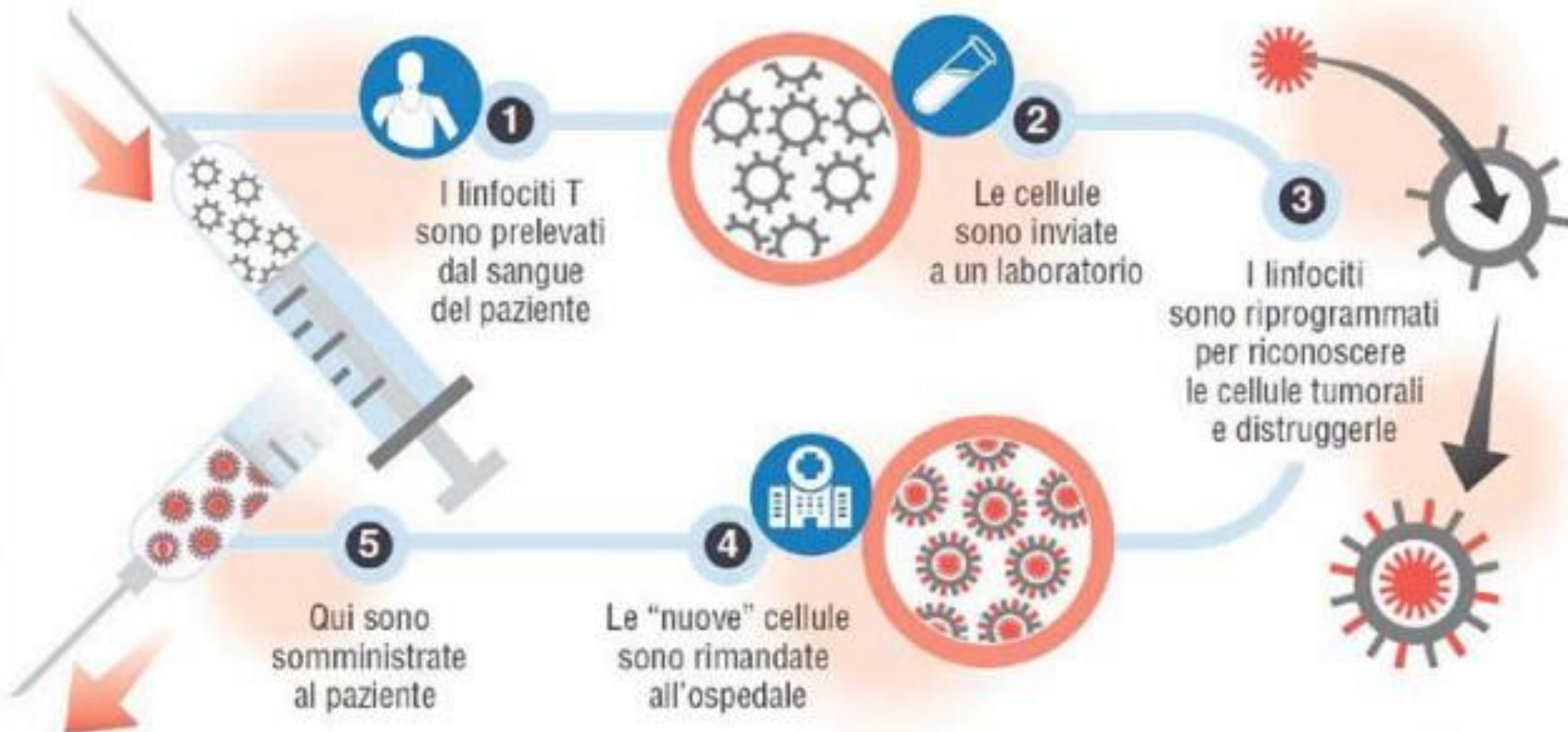
Le CAR-T rientrano tra le cosiddette terapie avanzate, frutto dei progressi scientifici nel campo della biotecnologia cellulare e molecolare. Sono, più nello specifico, terapie geniche, poichè agiscono attraverso l'inserzione di materiale genetico all'interno delle cellule dell'organismo umano.

Le CAR-T utilizzano specifiche cellule immunitarie (i linfociti T), che vengono estratte da un campione di sangue del paziente, modificate geneticamente e coltivate in laboratorio (“ingegnerizzate”) per essere poi re-infuse nel paziente per attivare la risposta del sistema immunitario contro la malattia.

Si distinguono, quindi, da altre terapie immunitarie note come “inibitori dei checkpoint immunologici” (come ad esempio gli anticorpi monoclonali), che mirano a togliere il freno alla risposta immunitaria, orientandola contro il cancro.

# Come funziona la terapia genica

L'Fda ha approvato un nuovo trattamento contro una forma di linfoma



# La tecnologia CAR-T



## CHE COS'È

Terapia genica o immunoterapia sperimentata su bambini e adolescenti affetti da Leucemia linfoblastica acuta

## COME SI PROCEDE

### Fase 1

Prelievo Linfociti T del paziente



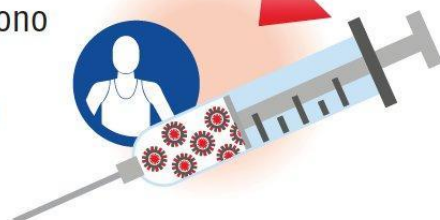
### Fase 2

Manipolazione genetica dei Linfociti T attraverso il CAR (Recettore Chimerico Sintetizzato in laboratorio)



### Fase 3

I Linfociti T manipolati vengono reinfusi nel paziente. Sono più forti. Riconoscono e attaccano il tumore



## L'ASPETTATIVA DI VITA DOPO LA CURA



**3/4 bambini**

guariscono completamente



**5 anni**

dopo la diagnosi sono ancora in vita:

● bambini



**82%**

● adolescenti



**87%**



**Ogni anno nel mondo si ammalano 250mila bambini**



**400 nuovi casi solo in Italia**

## PREVISIONE NEOPLASIE 2016 - 2020

**7.000** bambini

**4.000** adolescenti

# Esistono due tipologie di terapia genica:

→ delle **cellule germinali** = il materiale genetico viene trasferito all'interno delle cellule germinali (spermatozoi ed ovociti) **o delle cellule staminali totipotenti** (dei primissimi stadi dello sviluppo dell'embrione). In questo caso la modifica si trasmette anche alla prole; attualmente tale possibilità presenta molti limiti pratici ed etici.

→ delle **cellule somatiche** = modifica il genoma dell'individuo ricevente e gli effetti della modifica sono limitati all'individuo e non si riscontrano nella prole. Oggi è la via più studiata e tentata.

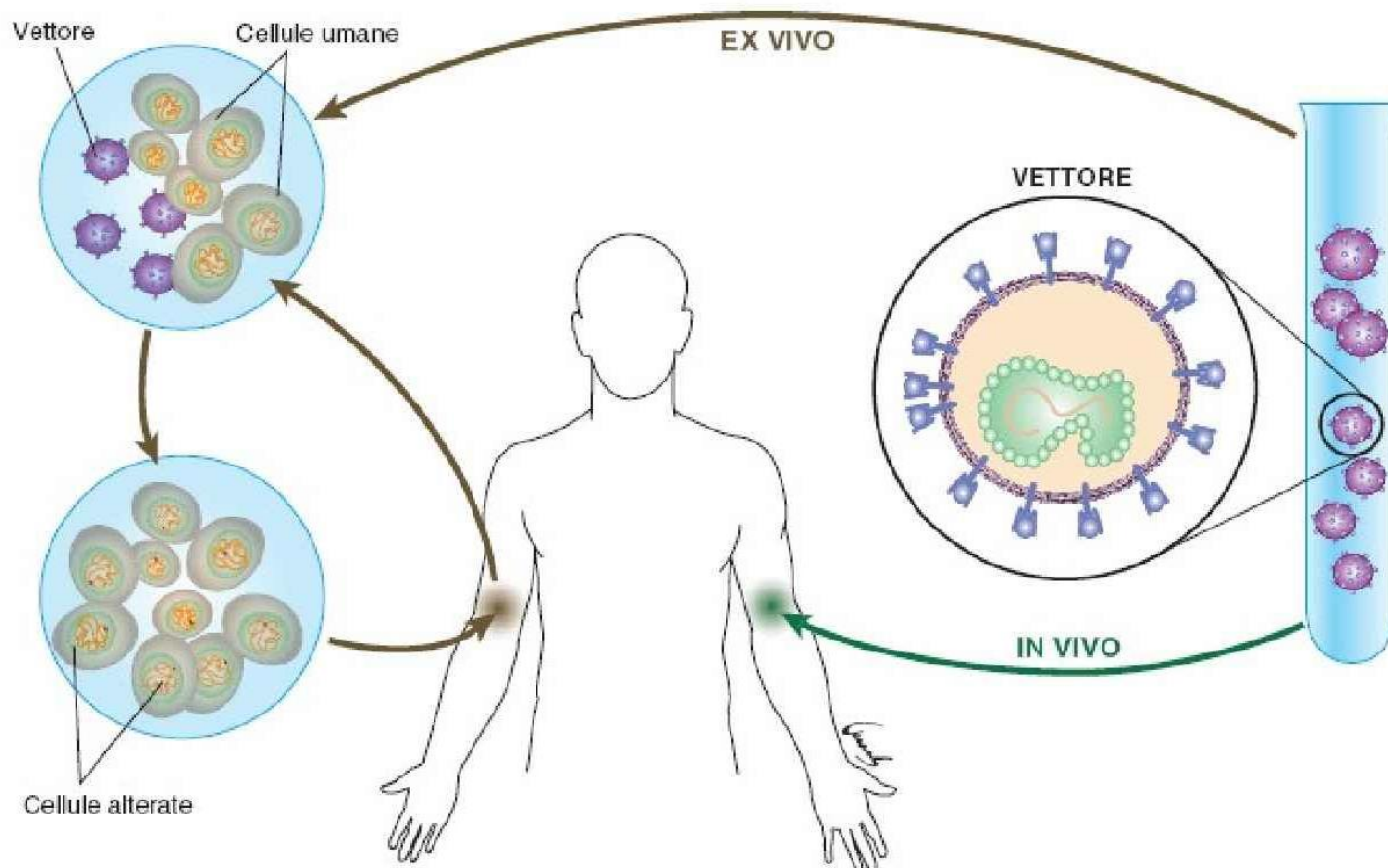


# La terapia genica delle cellule somatiche, a sua volta, viene suddivisa in due gruppi: la terapia genica "ex vivo" e quella "in vivo"

"ex vivo" = prelevare **le cellule somatiche della persona interessata e metterle in coltura**. Le cellule vengono "trasfettate" con il gene d'interesse, inserito tramite un apposito vettore (spesso vengono usati vettori virali) e successivamente reinfuse o reinpiantate nel corpo del soggetto. Si tratta di una procedura lunga e costosa ma permette di selezionare ed amplificare le cellule d'interesse. Attualmente è la modalità più utilizzata.

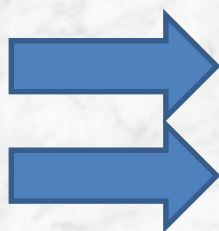
"in vivo" = viene attuata **in tutti quei casi in cui le cellule non possono essere messe in coltura o prelevate e reimpiantate**, come ad esempio quelle del cervello o del cuore e della maggior parte degli organi interni. In questo caso il gene viene inserito nell'organismo tramite un apposito vettore, direttamente per via locale o sistemica.

Questa metodica ha un'elevata compliance ed è molto economica, ma di più difficile applicazione



◆ **FIGURA 21.8**

**Schema di un intervento di terapia genica ex vivo**, nella quale le cellule del paziente vengono prelevate, trasdotte tramite un vettore virale in laboratorio e ritrapiantate (frecche marroni), ed *in vivo*, nella quale il vettore virale viene somministrato direttamente all'interno del paziente (freccia verde).



patologie congenite

patologie acquisite (cancro, malattie infettive)

# PRINCIPALI TECNOLOGIE PER IL TRASFERIMENTO GENICO IN CELLULE SOMATICHE UMANE

## requisiti:

- **efficienza** (no. cellule sufficienti per correggere il difetto genetico)
- **stabilità** (tempo di permanenza del gene trasfettato sul genoma cellula bersaglio)
- **funzionalità** (capacità di esprimere l'informaz. genetica trasferita)
- **sicurezza** (rischi potenziali/beneficio paziente)
- **applicabilità** (trasformazione procedura in protocollo di applicazione clinica)

**-Vettori e modalità di trasferimento  
genico**

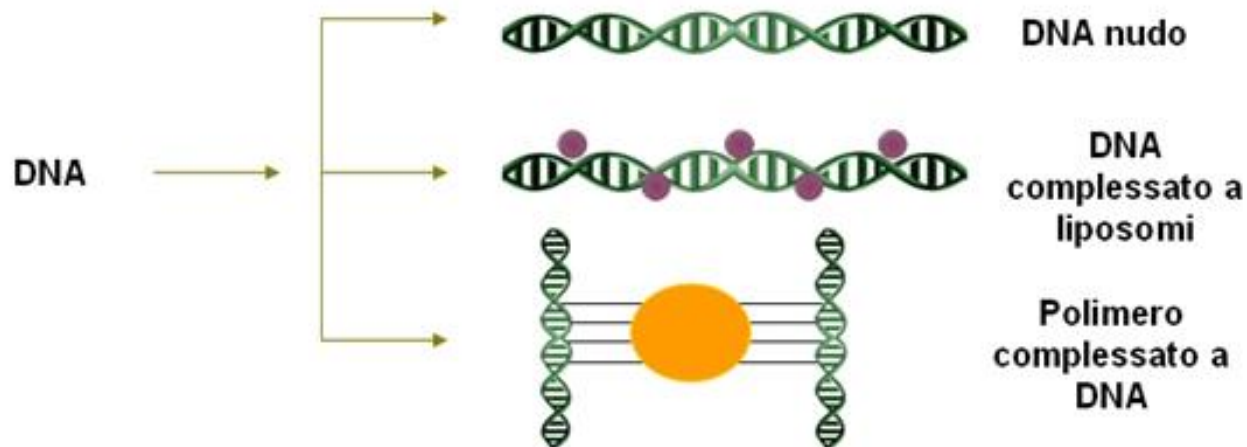
# Vettori utilizzati per terapie geniche

Per trasferire **il transgene** nella cellula bersaglio è necessario disporre di un sistema in grado di veicolarvi all'interno il DNA, cioè un vettore.

Esistono due grandi categorie di vettori che consentono il trasferimento genico:

- **Vettori non virali**: si basano sull'uso di DNA, da solo o complessato a molecole che ne facilitino l'ingresso nella cellula

Vettori non virali



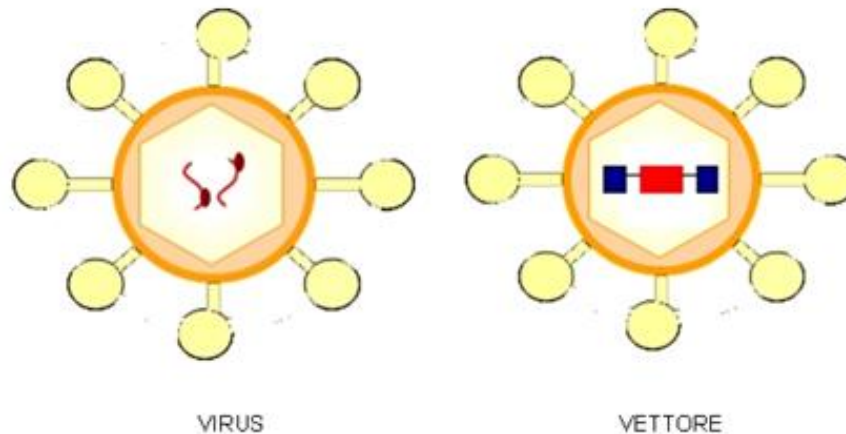
- **Vettori virali:** si basano sull'utilizzo di virus opportunamente modificati in modo tale da poter veicolare il genoma all'interno delle cellule bersaglio senza dare malattia (**retrovirali, adenovirali, herpes simplex, adenoassociati**)

I virus sono entità **specializzate nel trasferimento di informazione genetica** nelle cellule → **Per questa ragione si è pensato di sfruttare questa loro peculiarità adattandola alle opportune necessità.**

A differenza dei virus, i vettori da essi derivati **non sono in grado di portare a termine un'infezione produttiva in seguito all'introduzione del materiale genetico** (trasduzione).

Tuttavia gli organismi hanno sviluppato barriere fisiche e biologiche per evitare proprio l'introduzione di materiale genetico esogeno al loro interno da parte dei virus. Questo rappresenta una difficoltà da tenere in considerazione nello sviluppo e nell'applicazione dei vettori virali.

Il costrutto di un vettore virale prevede la delezione parziale o totale di alcuni geni virali solitamente responsabili dell'attività patologica , ma non indispensabili per l'inserimento del transgene nella cellula.



L'eliminazione di parti del genoma virale originale consente anche di avere maggior spazio a disposizione per inserire la cosiddetta "cassetta di espressione" contenente il transgene.

Non esiste un vettore ideale adatto per ogni situazione, ma ognuno di essi è caratterizzato da vantaggi e svantaggi da prendere in considerazione di volta in volta, in relazione alle caratteristiche della patologia da trattare.

## VETTORI RETROVIRALI

### Caratteristiche:

- virus a RNA;
- enzima trascrittasi inversa permette di sintetizzare un DNA complementare;
- capacità di integrazione del DNA complementare in quello cromosomico;
- veicolano inserti di DNA lunghi sino a 8kb.



### Vantaggi:

- DNA integrato in modo stabile anche nella progenie cellulare permette una terapia genica a lungo termine;
- applicazione in tumori di tessuti non proliferanti dove solo cellule cancerogene sono in attiva replicazione consentendo una infezione selettiva rispetto al tessuto circostante.

### Svantaggi:

- non applicabile a terapia genica *in vivo* per clearance virale da parte del sistema immunitario;
- bassa produzione;
- infettano solo cellule in attiva replicazione non adatti nelle patologie con tessuti con replicazione cellulare ridotta o nulla (es. tessuto nervoso).



## VETTORI ADENOVIRALI

### *Caratteristiche:*

- virus a DNA ;
- tropismo particolare per l'epitelio respiratorio, la cornea ed il tratto gastrointestinale;
- infettare un'ampia gamma di tipi cellulari;
- non c'è integrazione del DNA;
- veicolano inserti di DNA lunghi sino a 7-8kb.



### *Vantaggi:*

- possono essere prodotti con titoli elevati;
- applicazione nella terapia genica per patologie genetiche ereditarie.

### *Svantaggi:*

- non è possibile avere un'espressione a lungo termine dei geni inseriti per mancanza di integrazione;
- difficile applicazione in terapia genica contro il cancro potendo infettare ogni tipo di cellula non è possibile avere una azione di tossicità selettiva solo per cellule cancerogene;
- inducono forti risposte immunitarie.

# TERAPIA GENICA dei TUMORI

considerando i tumori come difetti GENETICI

- ❖ indurre una cellula tumorale a produrre citochine che stimolano la risposta immune
- ❖ indurre i linfociti a migliorare la risposta producendo fattori citotossici TNF

Terapia Genica di tumori solidi con la trasduzione di geni che hanno sensibilità ad un farmaco specifico

Terapia Genica di malattie infettive (HIV): si basa sul trasferimento nel genoma di cellule del sistema immunitario CD4 l'informazione genetica capace di interferire con le capacità vitali del virus dell'HIV

## - Tecnologie del DNA ricombinante

La tecnica del DNA ricombinante è alla base delle moderne biotecnologie e della terapia genica

Gli scopi di questa operazione possono essere diversi:

→ **determinare un miglioramento genetico nell'individuo ricevente** (per esempio, una maggiore resistenza agli attacchi dei parassiti),

→ oppure utilizzare l'organismo ricevente per clonare il gene introdotto e servirsi della cellula ospite come una «fabbrica» per la produzione di molecole utili.

Si definisce ***tecnologia del DNA ricombinante*** l'insieme delle tecniche di laboratorio che consentono di isolare e tagliare brevi sequenze di DNA per trasferirle e inserirle nel genoma di altre cellule, in modo da modificarne uno o più geni.

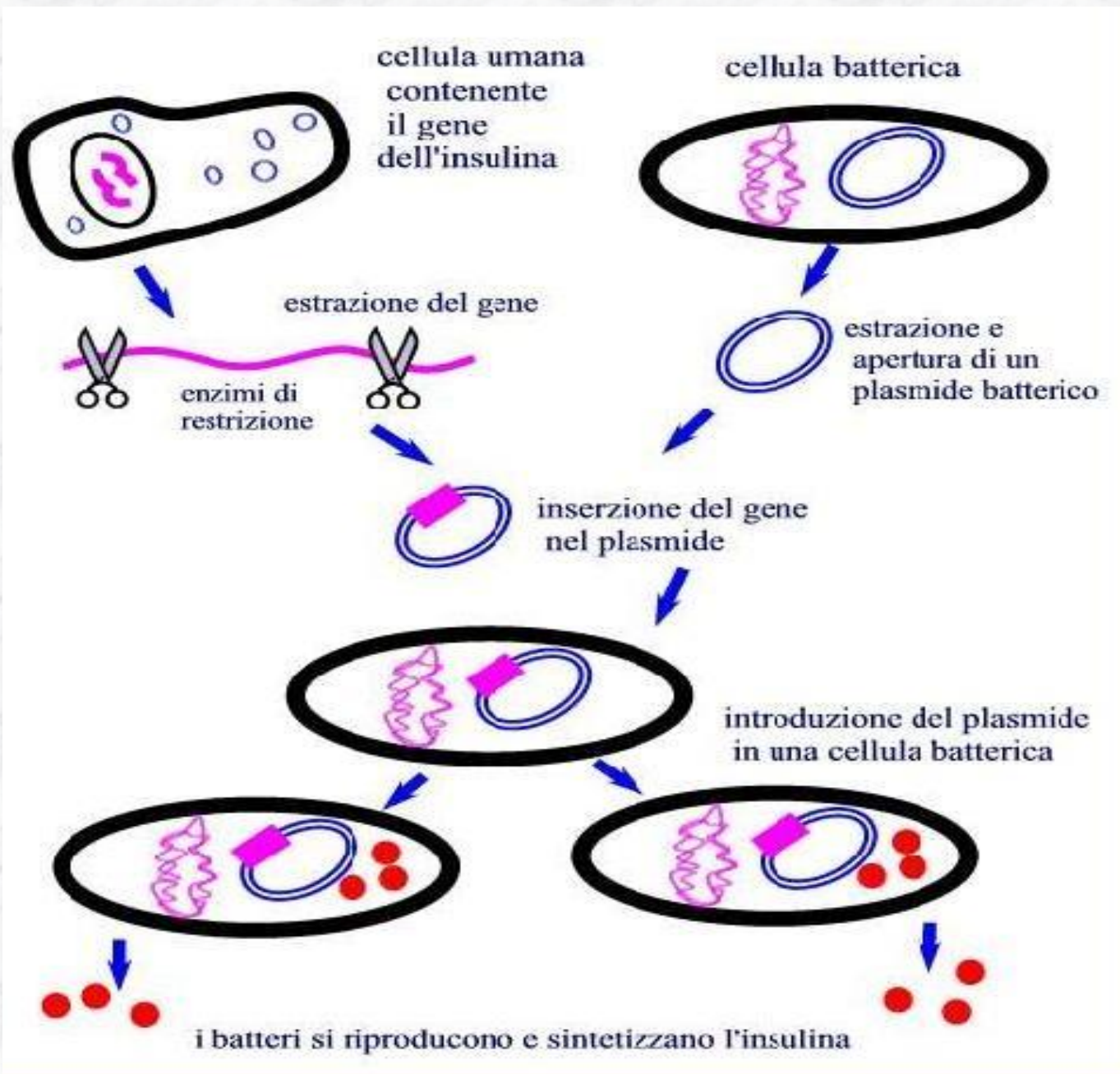
→ Questa tecnologia permette interventi mirati, che **modificano in modo specifico solo i geni dei caratteri su cui si vuole agire.**

→ Inoltre, le metodologie odierne consentono di **trasferire DNA non solo tra individui della stessa specie, ma anche tra specie diverse**, spesso molto differenti l'una dall'altra.

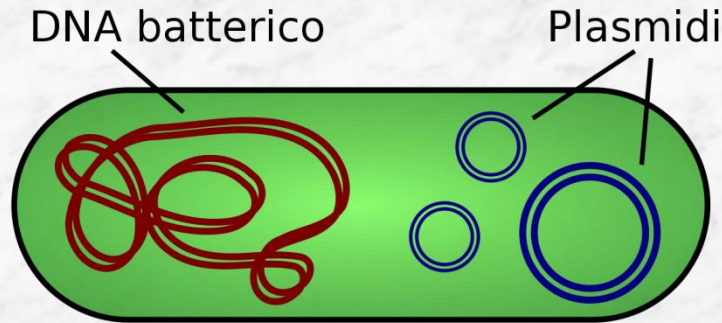
Es. Si possono trasferire geni da un batterio a una pianta o introdurre in un batterio un gene proveniente da una cellula eucariotica.

La tecnologia del DNA ricombinante consiste nel:

- **identificare il gene;**
- **tagliarlo e isolarlo** dalla molecola del DNA;
- **unire il gene a un vettore** a sua volta costituito da DNA;
- **trasferirlo all'interno di una cellula ricevente.**



**I plasmidi** sono piccoli filamenti circolari di DNA superavvolto a doppia elica, presenti nel citoplasma e distinguibili dal cromosoma batterico per le loro dimensioni ridotte.



Per le loro caratteristiche, i plasmidi trovano largo impiego in biologia molecolare e nell'ingegneria genetica, **poiché possono essere manipolati per produrre vettori ricombinanti, o di clonaggio**): si parla in questo caso **di plasmidi ricombinanti**



Utilizzare l'organismo ricevente per clonare il gene introdotto e servirsi della cellula ospite come una «fabbrica» per la produzione di molecole utili.

# Clonaggio applicato ai geni

Inserimento di un gene in una cellula qualsiasi (batterio, linea cellulare, cellula uovo):

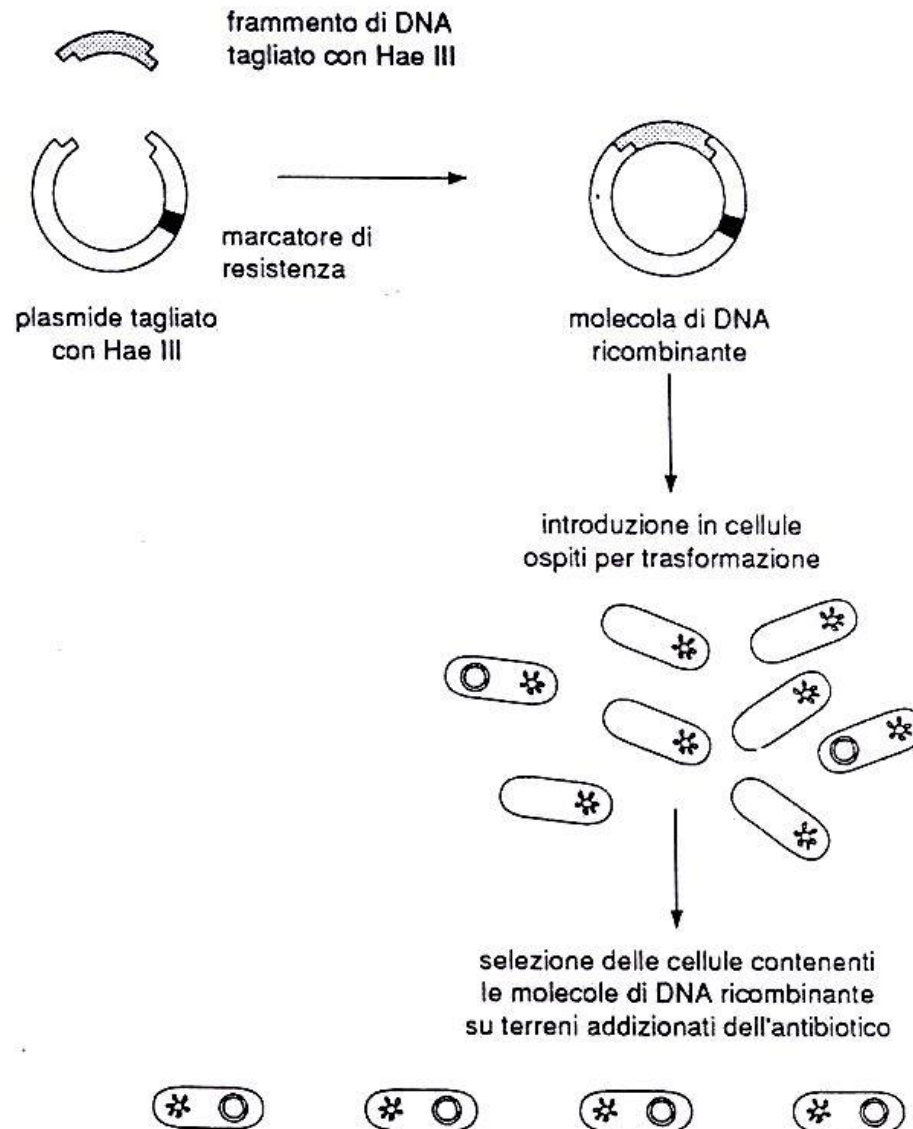
- **Trasmissione del gene inserito attraverso la replicazione** della cellula stessa (gene clonato)
- **Produzione di organismi geneticamente modificati** (transgenici)

**Esistono essenzialmente due tecnologie di clonaggio:**

→ la prima (anni '70) utilizza per il clonaggio del DNA gli enzimi di restrizione e vettori di clonaggio. Il frammento d'interesse deve essere isolato con enzimi di restrizione e quindi inserito in un vettore (tipicamente un plasmide) mediante reazione di ligasi. Il vettore così ottenuto viene inserito nella cellula ospite, che viene coltivata in terreni selettivi.

→ Un secondo tipo di clonaggio, oggi ampiamente più usato e che ha rivoluzionato la biologia molecolare, è divenuto possibile nel 1985 con la messa a punto **della reazione a catena della polimerasi o PCR**.

# Clonazione del DNA di un batterio





## Reazione a catena della polimerasi PCR

- ✓ Amplificazione di DNA genomico
- ✓ Amplificazione di RNA genomico
- **Analisi di malattie genetiche** (amplificazione di un gene per individuare mutazioni o delezioni)
- **Identificazione di virus HIV, epatite B** (NB: falsi positivi)

# Il polimorfismo è comune in natura, legato alla biodiversità, alla variabilità genetica e alla capacità di adattamento

**Polimorfismo genetico** quando una **variazione genetica** ha una prevalenza maggiore dell'1% nella popolazione.

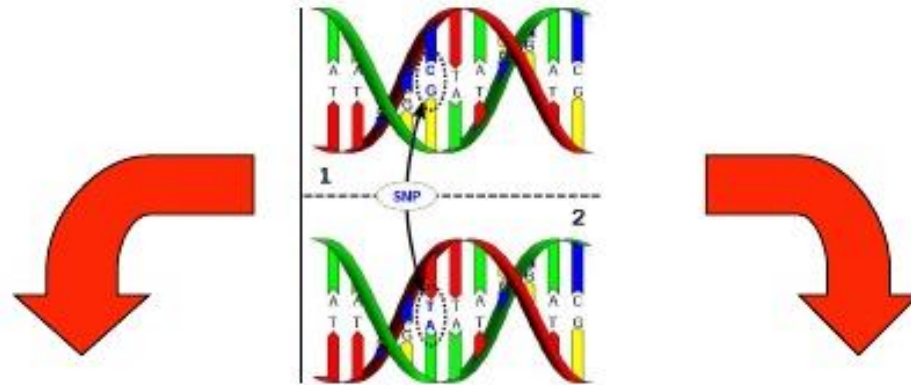
La variazione genetica può essere determinata da sostituzioni, delezioni o inserzioni di basi nel DNA e può riguardare regioni codificanti e regioni non codificanti.

→ Le conseguenze di questi polimorfismi possono essere **silenti con una variazione proteica con la stessa funzione**, oppure una variazione nella sequenza aminoacidica che non altera la struttura della proteina

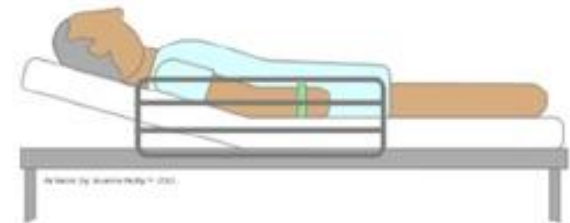
→ **e non silenti** quando si avrà un cambiamento del fenotipo, ad esempio si avranno **proteine modificate la cui funzione risulterà alterata.**

**Un polimorfismo genico può essere associato ad una determinata patologia !!!**

# POLIMORFISMI E MUTAZIONI

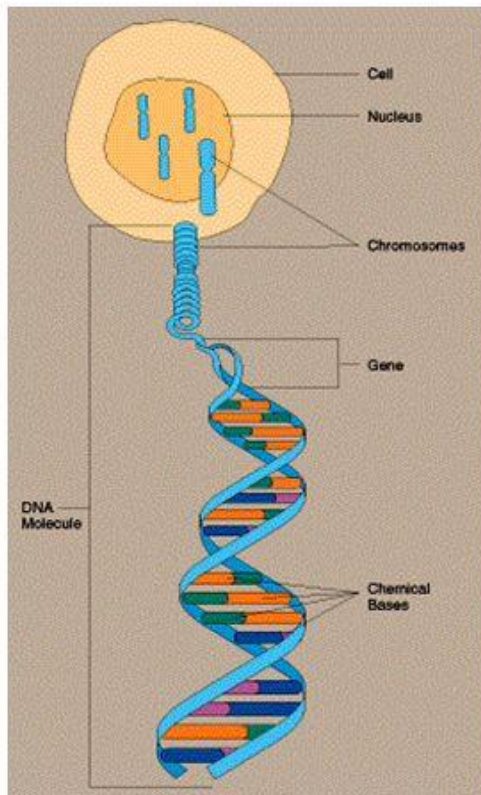


**Alterazioni fenotipiche**



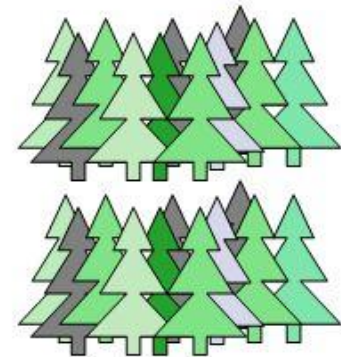
**Alterazioni funzionali**

# Gli SNP (single nucleotide polymorphism)



...CC **A** TTGAC...  
...GG **T** AACTG...

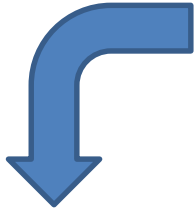
...CC **G** TTGAC...  
...GG **C** AACTG...



## Che cos'è uno SNP ?

- E' una differenza, o polimorfismo, di un singolo nucleotide nella sequenza di DNA esistente in alcuni individui della stessa specie.
- Il loro numero varia notevolmente a seconda della specie
  - In uomo c'è in media uno SNP ogni 300 nucleotidi

# Identificazione di polimorfismi genici può



*essere effettuata tramite di genotipizzazione* che sfrutta **la PCR** che consente di produrre in poche ore miliardi di copie di un segmento di DNA, che può essere analizzato per la **ricerca di varianti alleliche** putativamente legate a un tratto di personalità o a una psicopatologia

***DNA fingerprinting*** = identificazione di aree polimorfe del DNA conferisce l'impronta propria di un individuo

# IDENTIFICAZIONE di POLIMORFISMI GENICI

*tutto ciò è utile*

per la diagnosi di malattie metaboliche genetiche

- aterosclerosi
- ipertensione
- malattie emopoietiche
- neoplasie
- malattie infettive

per la terapia farmacologica (terapia genica)

(sviluppo futuro)

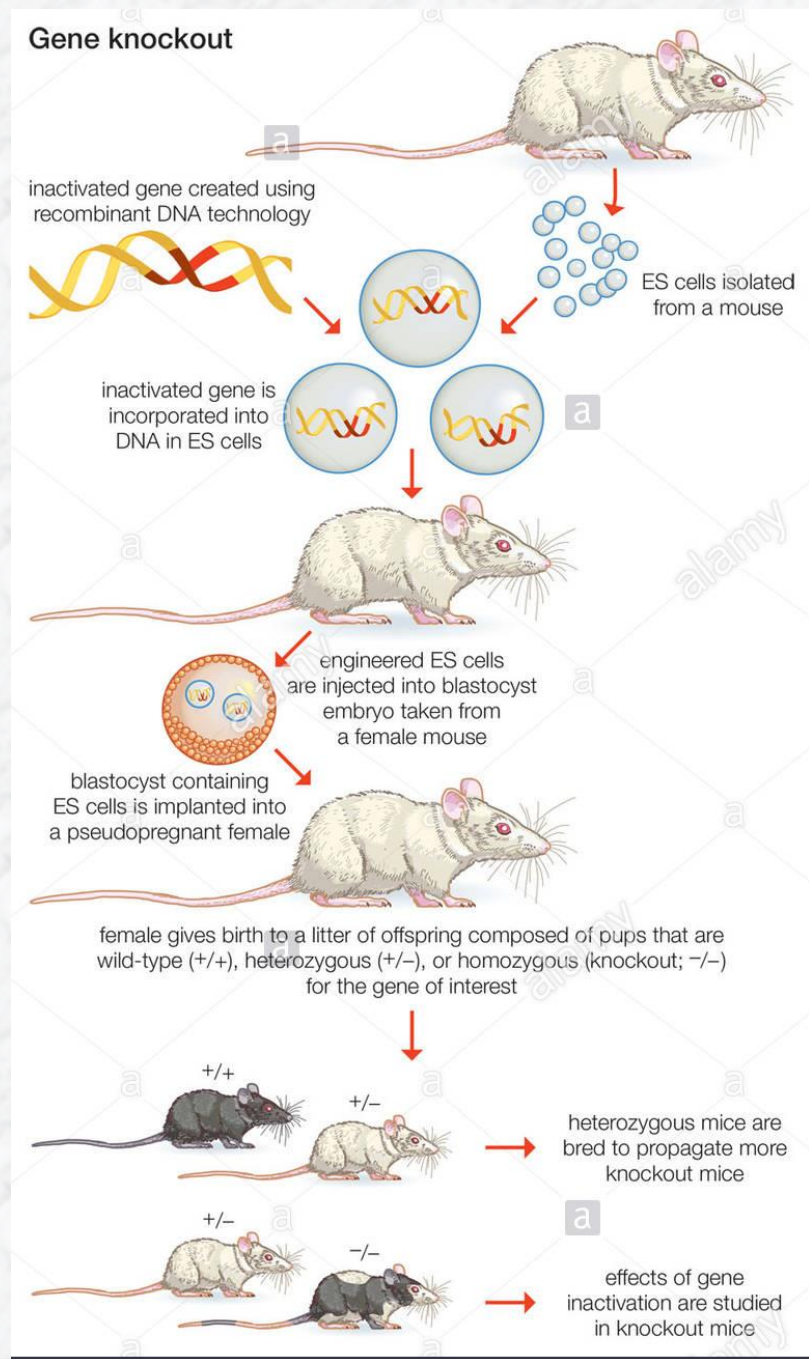
Studi di mutagenesi per comprendere le caratteristiche di una repressione genica

→ sfruttano la tecnica del DNA ricombinante

ES cells= Embryonic Stem Cell

sono usate per vari scopi in biologia, uno di questi è **la realizzazione di organismi geneticamente modificati**

**SONO CELLULE NON DIFFERENZIATE**, quindi ancora dotata della potenzialità di dare origine a ogni tipo istologico presente nell'organismo di cui fa parte



# SONDE GENETICHE / DIAGNOSTICHE

sono frammenti di acidi nucleici a filamento singolo o doppio

possono essere

**a DNA**

o

**ad RNA**

clonate

o

sintetiche

cDNA cRNA in vettori (2-20 kb)

(18-30 nucleotidi)



**per la diagnosi e identificazione di agenti patogeni**



# Farmaci biotecnologici

- ❖ **Produzione di nuovi farmaci (ormoni, fattori di crescita, citochine)**
- ❖ **Nuovi meccanismi d'azione**

Il primo farmaco biotecnologico commercializzato per uso terapeutico nel 1982 è stata l'**insulina** ricombinante

**Farmaci biotecnologici di prima generazione** (proteine terapeutiche, anche di origine umana, su larga scala)

**Farmaci biotecnologici di seconda generazione** (peptidi, oligonucleotidi antisenso che hanno principale applicazione come sonde diagnostiche)

# 1) Proteine terapeutiche

ormoni / proteine la cui sintesi è diminuita  
fattori per il potenziamento di risposte immunitarie

produzione di proteine

- in batteri
- in animali transgenici

## Fattori limitanti:

- attività biologica
- minima risposta immunitaria del paziente
- somministrazione:
  - limitata attività
  - facile degradabilità
  - (via endovenosa)

**Tossicità di proteine  
biotecnologiche effetti  
collaterali →  
cautela!!!!**

vettori virali con limitazione da virulenza per  
direzionare il farmaco

bioreattori da impiantare sottocute per  
prolungare attività

## **2) Vaccini**

- ❖ **vettori ingegnerizzati per produzione su larga scala di antigeni utilizzati per la preparazione di vaccini sintetici**
- ❖ **ingegnerizzare il genotipo di virus e batteri ha permesso di ideare nuovi metodi di attenuazione per realizzare vaccini con microorganismi vivi**
- ❖ **conoscenza dei meccanismi molecolari e cellulari di immunità ha permesso la razionalizzazione nel disegno di nuovi vaccini**

### ***3) Biotecnologie e ricerca farmacologica***

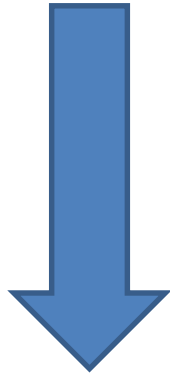
- ❖ Individuazione di geni a potenziale oncogenico e dei meccanismi che ne determinano l'espressione in cellule neoplastiche
- ❖ malattie ereditarie

**finalità: blocco dell'espressione del gene  
sostituzione del gene**

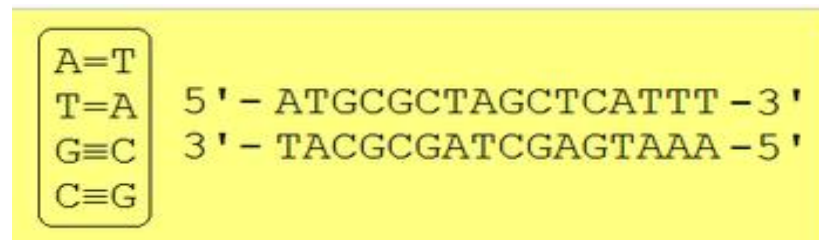
**Impiego di modelli animali transegenici**

Uso Farmacologico degli  
oligodeossinucleotidi antisenso (aODN)  
sintetici

Per oligonucleotide antisenso si intende un breve frammento di DNA, che contiene la sequenza nucleotidica complementare del filamento di DNA codificante (senso) o di RNA messaggero (mRNA).



Es. sequenza di DNA



Perciò l'antisenso, grazie a questa sua "specularità" si appaia al DNA o all'mRNA, annullandone l'attività biologica.

→ Gli oligonucleotidi di impiego in terapia sono sintetici, ma nelle cellule sono stati individuati anche oligonucleotidi endogeni, di cui è ignota la funzione

# GLI OLIGONUCLEOTIDI ANTISENSENTO (aODN)

mRNA



A G U A G C U A G C U A G

... ..

A T C G A T C

aODN



L'aODN si lega in modo specifico alla sequenza complementare dell'mRNA. Il tratto di catena ibrida che così si forma determina per via enzimatica o per impedimento sterico l'inattivazione dell'intero messaggero

**Meccanismo d'azione → gli ODN possono interrompere la sequenza di trascrizione ed espressione di un gene/o proteina a diversi livelli**

- 1. Appaiandosi alla doppia elica di DNA ne modificano la conformazione spaziale, impedendo la formazione del complesso di inizio della trascrizione genica (blocco totale della sintesi) (TRIPLEX)**
- 2. Appaiandosi al trascritto primario impediscono il *processing* dell'RNA**
- 3. Appaiandosi all'RNA citoplasmatico bloccano la traduzione in proteina**
- 4. Appaiandosi all'RNA ne favoriscono la degradazione ad opera di enzimi (RNAsi)**
- 5. APTAMERI = sono brevi seq. di acidi nucleici che riconoscono proteine specifiche, che tramite tecnica SELEX vengono amplificati**
- 6. RIBOZIMI = sono seq. di RNA con funzioni enzimatiche che svolgono attività catalitica (es. scindono il legame fosfodiesterico di un mRNA)**



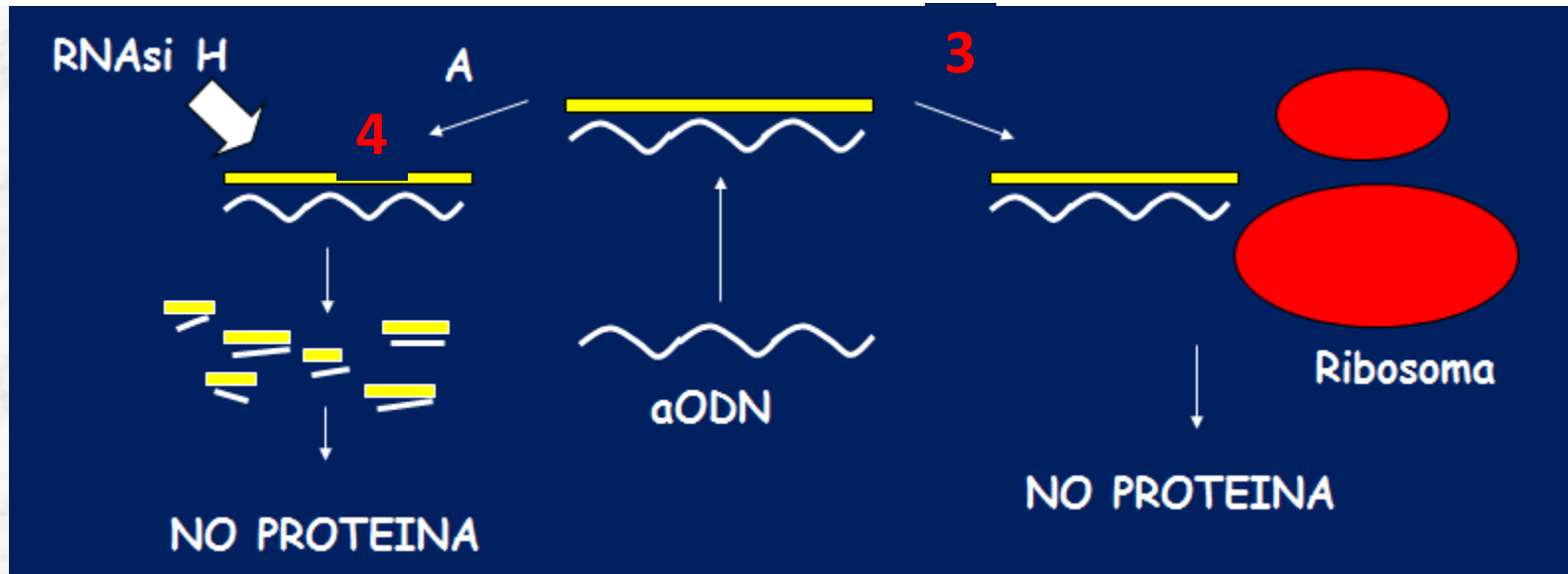
# Tra i meccanismi principali d'azione degli aODN

## 3- IMPEDIMENTO STERICO:

La catena di RNA-DNA impedisce la traduzione sui ribosomi, impedendo la sintesi della proteina

## 4- ATTIVAZIONE DA PARTE DELLA RNAsi H:

Degrada la componente di RNA delle catene ibride DNA-RNA



# APPLICAZIONI TERAPEUTICHE

## 1. CONTROLLO DELLA CRESCITA NEOPLASTICA

1^ GENERAZIONE: aODN contro mRNA importanti nel ciclo mitotico

**FOSFOROTIOATI:** Sono analoghi degli aODN naturali

**VANTAGGI:** stabili alle nucleasi, facile sintesi e attivazione dell'RNAsi H

**SVANTAGGI:** poco assorbiti e modesta tossicità

**METILFOSFONATI:**

**VANTAGGI:** - minore solubilità quindi maggiore concentrazione intracellulare

**SVANTAGGI:** - non attivano l'RNAsi H

2^ GENERAZIONE: aODN contro le traslocazioni cromosomiche di linfomi e leucemie

## 2. TERAPIA ANTIVIRALE

HIV: blocco delle proteine essenziali per il ciclo riproduttivo  
(TAT, REF)

Herpes Simplex: impiego clinico per cheratite erpetica  
Virus influenzali

### 3. CARDIOLOGIA

- **Ipertensione:** aODN contro geni che sintetizzano per molecole vasoattive (renina-angiotensina, recettore adrenergico, endotelina e neuropeptide  $\gamma$ , callicreina, peptide natriuretico atriale, NO, calcitonina)
- **Ischemia miocardica**
- **Nel controllo della proliferazione endotelio-intima muscolare delle arterie coronariche dopo stress meccanico (azione sull'm-RNA che codifica per il PDGF)**

# **PROBLEMATICHE RIGUARDANTI GLI ANTISENSO IN TERAPIA**

- 1. Scarsa riproducibilità negli esperimenti in colture cellulari**
- 2. Variabilità del grado di purezza delle diverse preparazioni**
- 3. Uptake cellulare ancora poco definito**
- 4. Costo elevato**
- 5. Risposta immunitaria indesiderata**

→ **GLI ACIDI NUCLEICI** possono essere target farmacologici

**A- BERSAGLIO MOLECOLARE PIU' DEFINITO**

Numero di proteine intracellulari: 1000-100000

Numero di RNA: 100-10000

Numero di geni: 1-2

**B- SINTESI MIRATA**

Bersagli possono essere sequenze anche uniche nel genoma

**C- AZIONE MOLTO SPECIFICA**

Utilizzando interazioni con altri nucleotidi si possono sfruttare i vantaggi della complementarità tra due catene secondo il modello di Watson e Crick