

CTF

Corso Farmaci Biologici

Terapia Genica

TERAPIA GENICA



→ il DNA come farmaco (p.a.)

È molto diversa dalle terapie classiche come quelle basate sui farmaci o sulla chirurgia.
Si tratta infatti di lavorare a livello del DNA

- Sostituire o bloccare un gene malato
- Inserire un gene mancante
- correggere gene difettoso
- Rendere le cellule visibili al sistema immunitario

Revertire il fenotipo patologico

SOMATICA

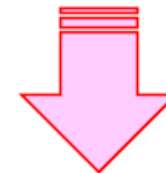
= cellule somatiche dell'adulto



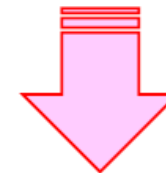
Manipolazione genica non riguarda la progenie

GERMINALE

= cellule riproduttive



Manipolazione genica verrebbe trasmessa alla progenie



NON AUTORIZZATA

VETTORI VIRALI

- Metodo appropriato di trasferimento → Serve un mezzo di trasporto in grado di far arrivare a destinazione il materiale genetico corretto, ma dotato di sicurezza



- ✓ Altamente efficienti
- ✓ Reazioni immunitarie
- ✓ Tossicità
- ✓ Mutagenesi

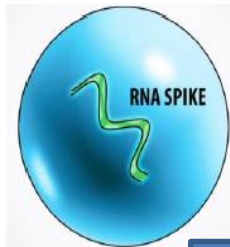
VETTORI VIRALI: TIPOLOGIE

Metodo	Vettore	Facilità di utilizzo/ preparazione	Immunogenicità	Efficienza	Integrazione	Svantaggi
Trasduzione virale	Retrovirus	++	Scarsa	Elevata	Sì, solo in cellule in divisione;	Possibile mutagenesi inserzionale
	Singolo filamento RNA; Gene trasmesso alle cellule figlie				stabile nel tempo	
	Lentivirus	++	Scarsa	Elevata	Sì	Possibile mutagenesi inserzionale
	Adenovirus	+	Elevata	Elevata	No	Espressione transiente del transgene
Supera BEE	Virus adenoassociato	+	Scarsa	Elevata	Sì	Possibile mutagenesi inserzionale
	Singolo filamento DNA; non patogeni per l'uomo					
	Herpesvirus	+	Possibile	Elevata	No	Difficoltà di manipolazione
	Doppio filamento DNA; neurotropico					

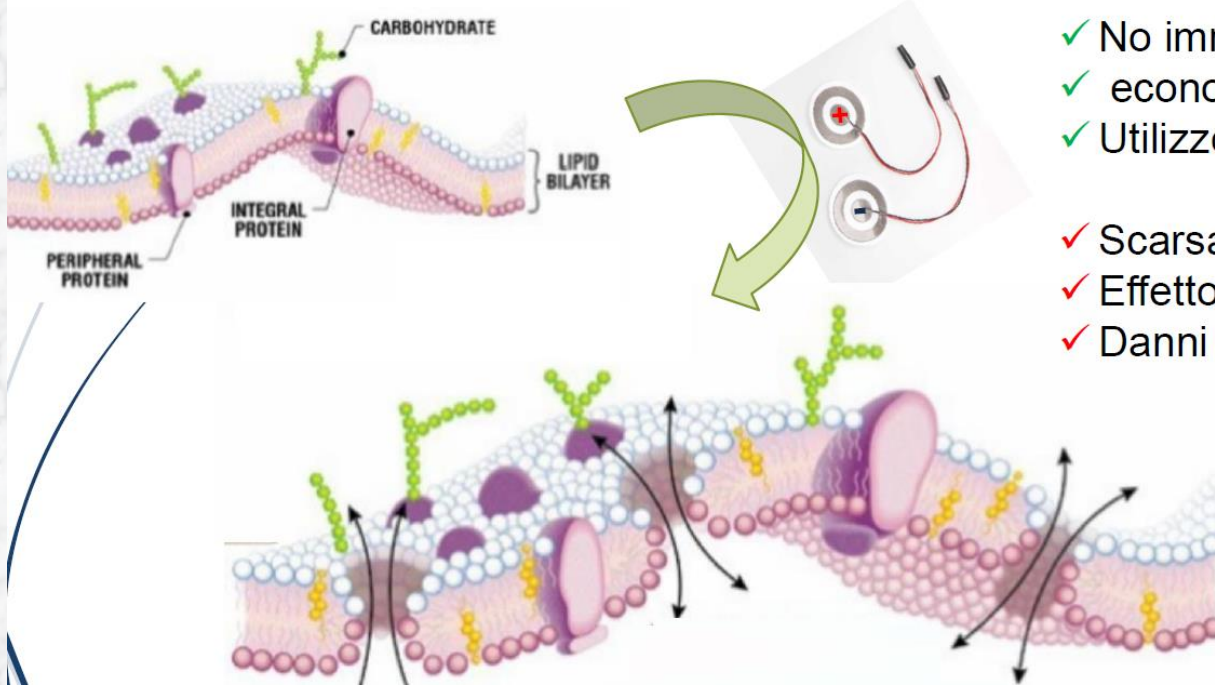
NON SOLO VETTORI VIRALI

Metodo	Vettore	Facilità di utilizzo/ preparazione	Immunogenicità	Efficienza	Integrazione	Svantaggi
Iniezione diretta	DNA nudo	+++	Scarsa	Scarsa	No; scarsa	Espressione transiente del transgene
Chimico	Liposomi	+++	Scarsa	Scarsa	No; scarsa	Espressione transiente del transgene
Fisico	Elettroporazione	+++	Scarsa	Scarsa	No; scarsa	Espressione transiente del transgene

Covid
19



ELETTROPORAZIONE



- ✓ No immunogenicità
- ✓ economico
- ✓ Utilizzo/manipolazione

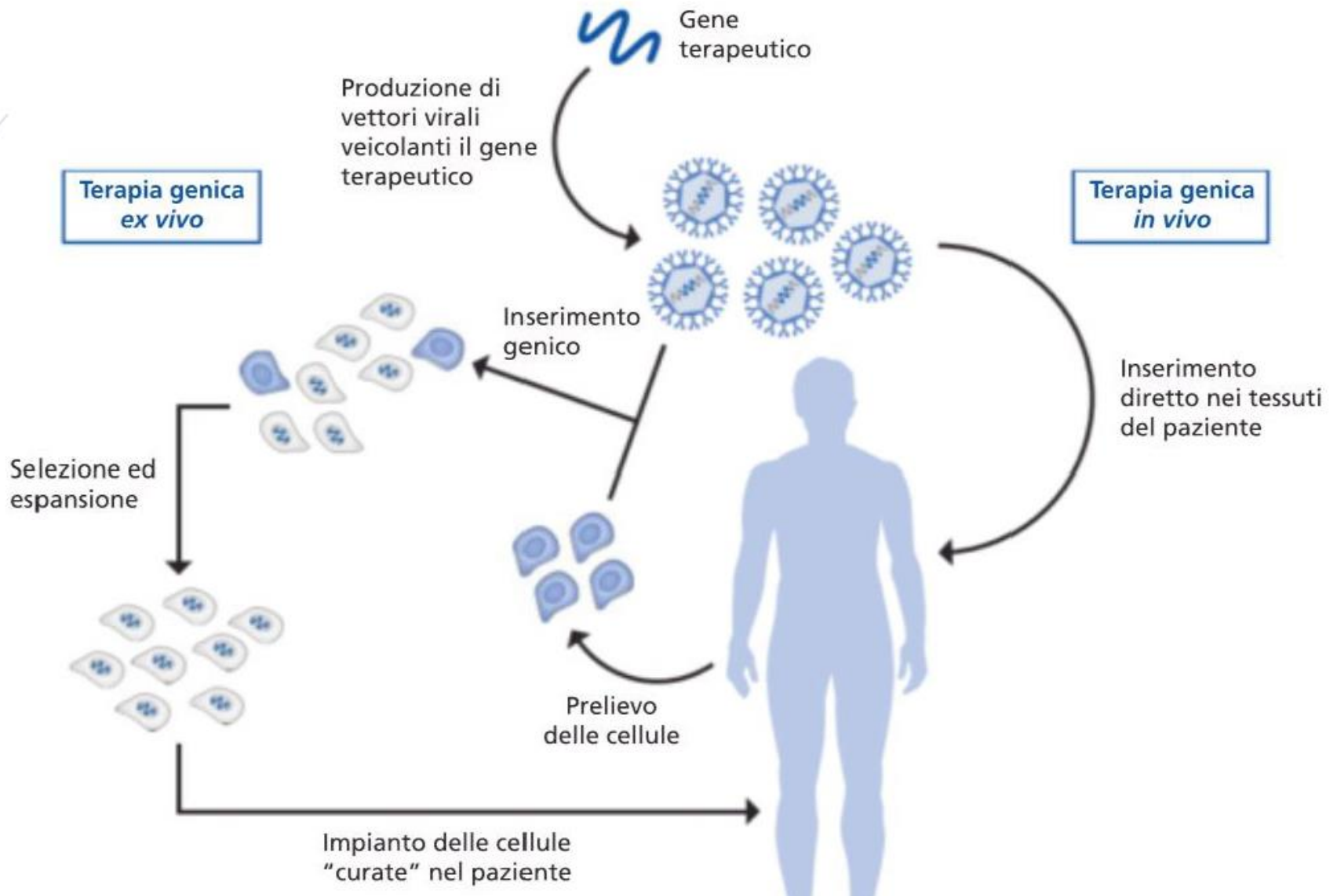
- ✓ Scarsa efficienza
- ✓ Effetto transiente
- ✓ Danni alle cellule?

Terapie Approvate

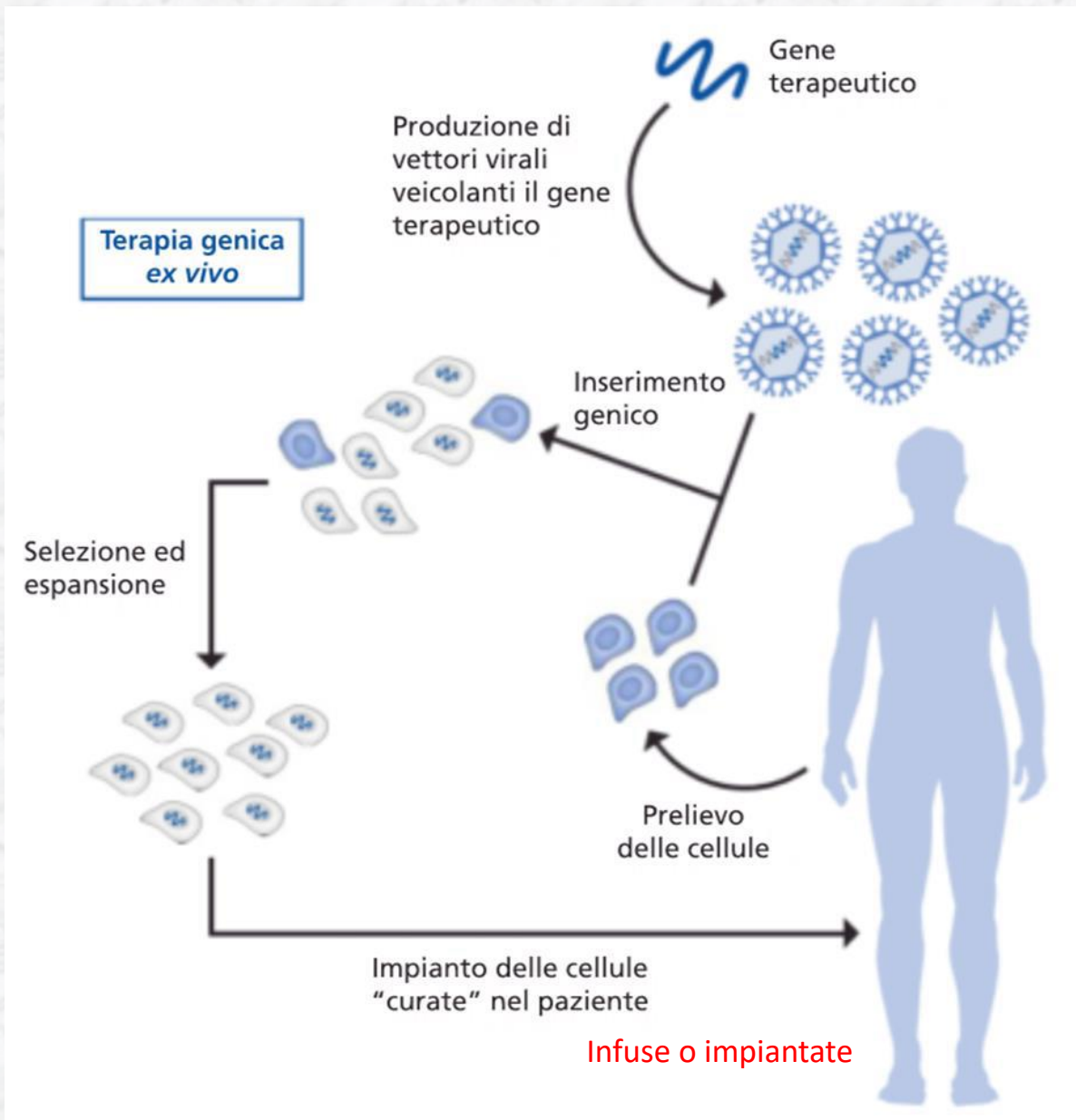
Patologia	Nome commerciale	Gene terapeutico	Cellula target	Vettore	Approccio
ADA-SCID	Strimvelis	<i>ADA</i>	Cellule staminali ematopoietiche	Retrovirus	<i>Ex vivo</i>
<i>Graft-Versus-Host Disease</i>	Zalmoxis	Timidina chinasi di HSV	Linfociti T	Retrovirus	<i>Ex vivo</i>
Leucemia linfoide acuta	Kymriah (Tisagenlecleucel)	<i>CAR</i> anti-CD19	Linfociti T (CAR-T)	Lentivirus	<i>Ex vivo</i>
Linfoma non-Hodgkin	Yescarta (Axicabtagene Ciloleucel)	<i>CAR</i> anti-CD19	Linfociti T (CAR-T)	Retrovirus	<i>Ex vivo</i>
Amaurosi congenita di Leber di tipo 2	Luxturna*	<i>LCA2</i>	Fotorecettori	AAV2	<i>In vivo</i>
Deficit di lipoproteina lipasi	Glybera**	<i>LPL</i>	Cellule muscolari	AAV1	<i>In vivo</i>

* In fase di approvazione; ** tolto dal commercio.

APPROCCIO *IN VIVO* oppure *EX VIVO*



Metodo EX VIVO



Ex vivo

- Più lunga
- Più costosa
- Maggior efficienza
- No problematica immunitaria
- Cellule eterologhe/autologhe
(personalizzate per evitare rigetto)

In vivo

- Sedi difficili da raggiungere
- Effetti off-targets (cellule bersaglio)
- Trasduzione del segnale
- Risposte immunitarie
- Inattivazione (complemento/Ac)
- Più semplice
- ottimizzabile → popolazione

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.

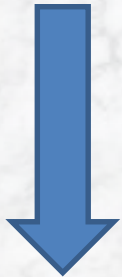
considerazioni bioetiche

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[^] → è necessario in primo luogo identificare il singolo gene o i diversi geni responsabili della malattia genetica.

2[^] → 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).

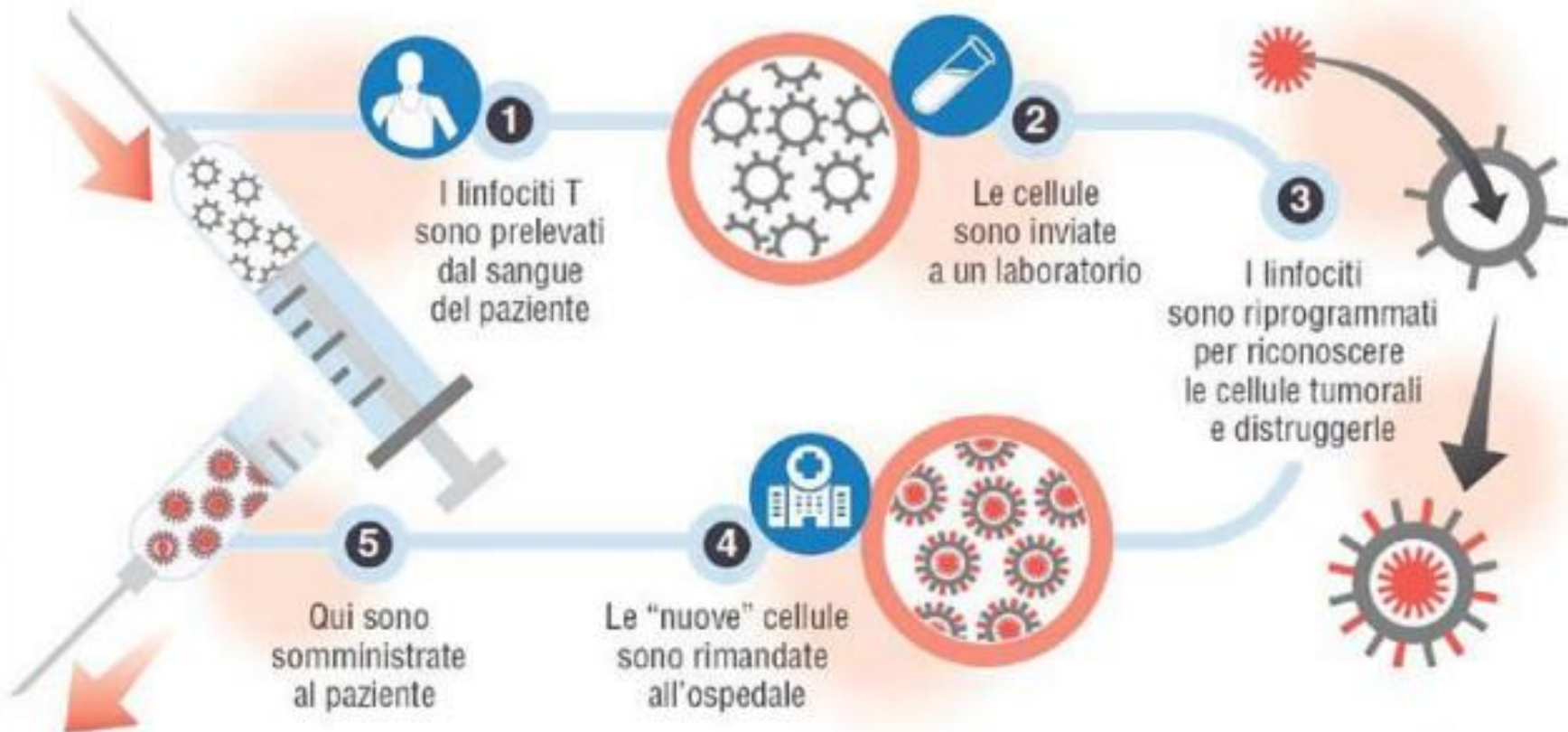
Le CAR-T rientrano tra le cosiddette terapie avanzate, frutto dei progressi scientifici nel campo della biotecnologia cellulare e molecolare. Sono, più nello specifico, terapie geniche, poichè agiscono attraverso l'inserzione di materiale genetico all'interno delle cellule dell'organismo umano.

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



1 Leukapheresis

5 Modified T-cell infusion

4 Chemotherapy

10d

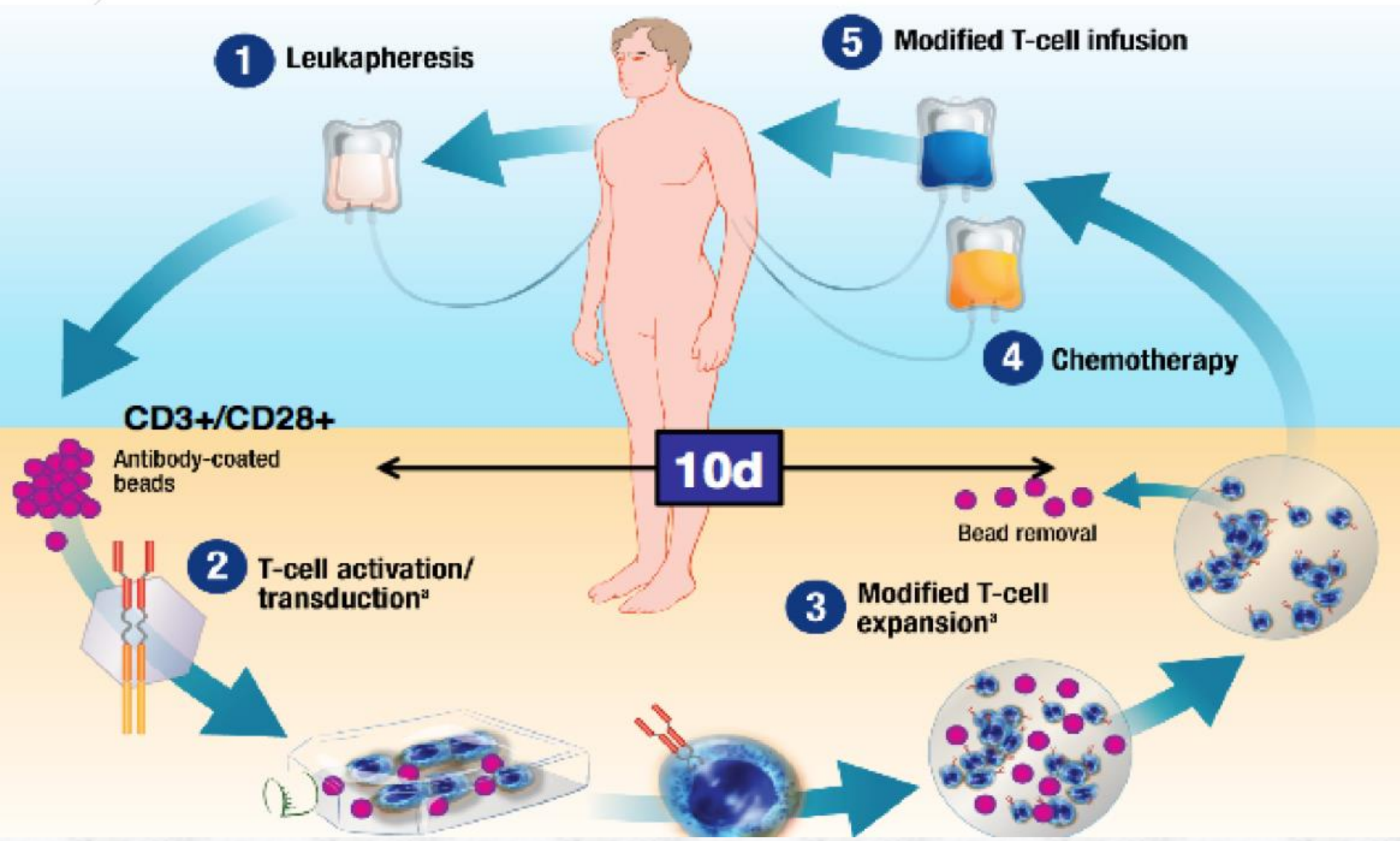
2 T-cell activation/
transduction^a

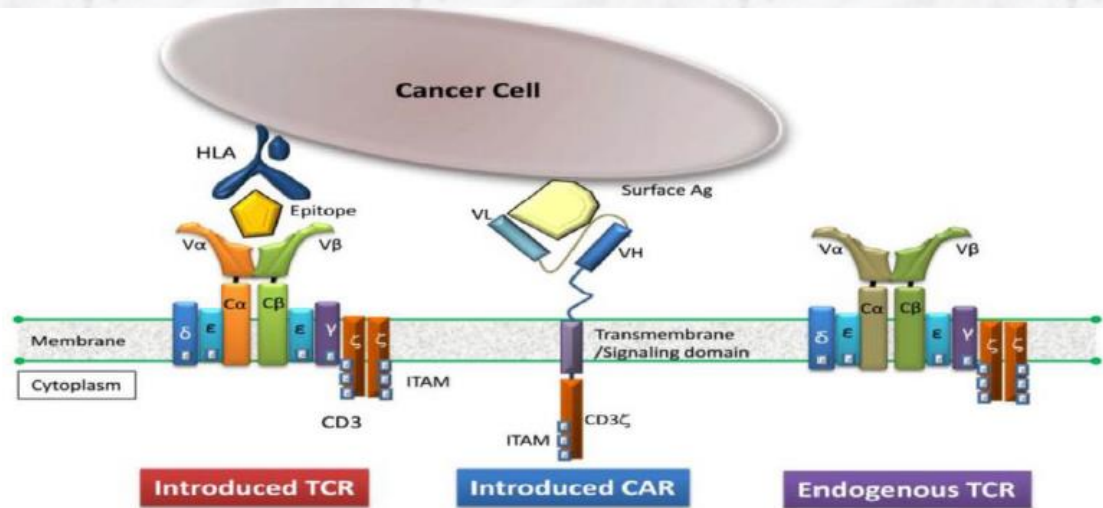
3 Modified T-cell
expansion^a

CD3+/CD28+

Antibody-coated
beads

Bead removal





ulteriore porzione TCR
 Costimolatori
 (amplificano la risposta)

Esternamente: porzione di un anticorpo
 anti-CD19, CD20, CD22, CD23
Internamente: la porzione TCR
 Specificità di Ac associate
 alle potenziale di un linfocita T

CAR-T: KYMRIAHA e YESCARTA

KYMRIAHA → anti-CD19

Leucemia linfoblastica acuta a cellule B (LLA a cellule B)

Linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL)

Precauzioni: Sodio (1-6% del fabbisogno giornaliero)

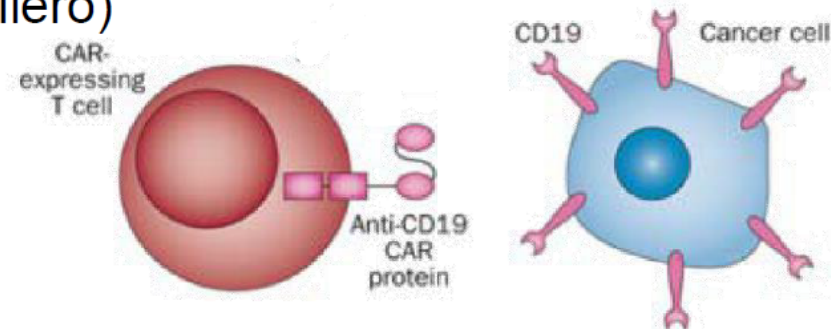
DMSO; Destrano (! primi minuti d'infusione se primo contatto)

YESCARTA → anti-CD19

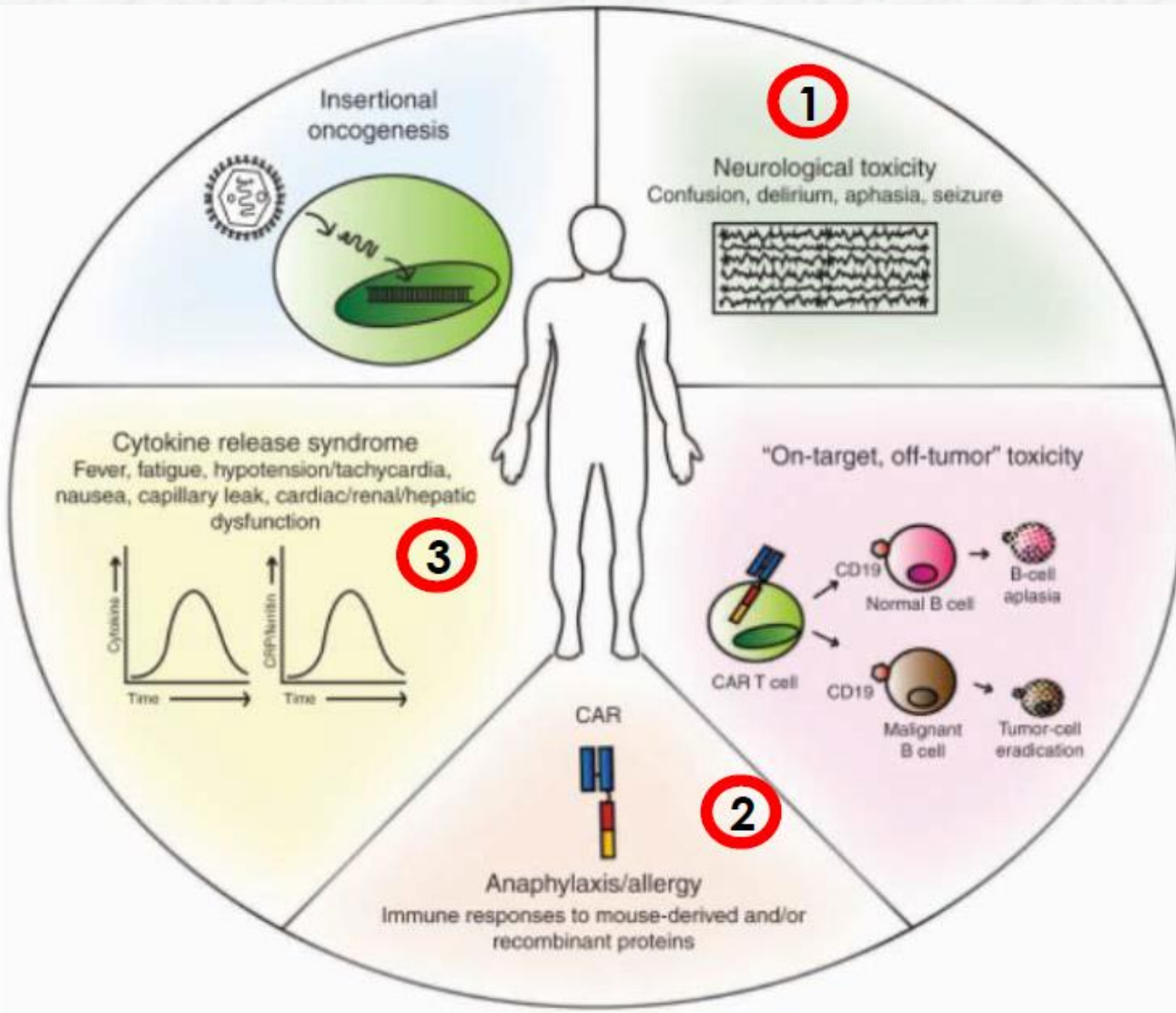
Linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL)

Linfoma primitivo del mediastino a grandi cellule B (PMBCL)

Precauzioni: Sodio (15% del fabbisogno giornaliero)



Tossicità della Cart-T



Studi con CAR-T approvati da FDA ed EMA/AIFA

TECARTUS → anti-CD19 (si AIFA)

Linfoma a cellule mantellari negli adulti (resistente/refrattario)

Precauzioni: Sodio (15% del fabbisogno giornaliero)

DMSO; Gentamicina (! → reazioni ipersensibilità)

BREYANZI → anti-CD19 (FDA – febbraio 2021; Giappone marzo 2021; in attesa EMA)

Linfoma a grandi cellule B (resistente/refrattario)

Precauzioni: Sodio (15% del fabbisogno giornaliero)

DMSO; Gentamicina (! → reazioni ipersensibilità)

ABECMA → anti-BCMA (solo FDA – marzo 2021; in attesa EMA)

Mieloma multiplo → refrattario a > 4 terapie

(immunomodulante; inibitore proteasoma; Ac monoclonale anti-CD38; già sottoposti a trapianto)

!! Non curativo (senza CAR-T → OS a 6 mesi)

Approvazione condizionata di ZYNTEGLO nel 2019

β -talassemia → ridotta produzione di β -globina = bassi livelli di globuli rossi = necessità di frequenti trasfusioni di sangue

ZYNTEGLO (approvato in Germania)

- > 12 anni con β -talassemia trasfusione-dipendente e genotipo non β^0/β^0 ;
- non è disponibile donatore compatibile (trapianto staminali ematopoietiche);

Senza ZYNTEGLO:

- trasfusioni croniche di sangue (tutta la vita) per mantenere adeguati livelli di emoglobina.
- terapia chelante per rimuoverne l'eccesso **ferro** (danni multiorgano)

Sospensione delle trasfusioni per precauzione nel marzo 2021

ZOLGENSMA 2021 ATROFIA MUSCOLARE SPINALE

I numeri in Italia:

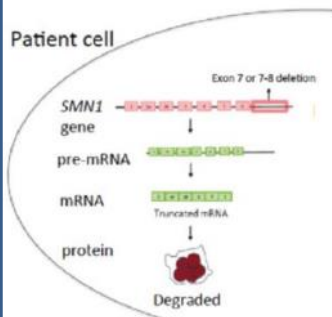
Nascono ogni anno ~ 40-50 bambini con la SMA

- patologia neuromuscolare rara;
- prima causa di morte genetica infantile.
- **Difetto/assenza SMN: gene essenziale**

Proteina per la sopravvivenza dei motoneuroni



La SMA di tipo 1 → forma più grave della malattia (colpisce ~ 20-25 bambini ogni anno).

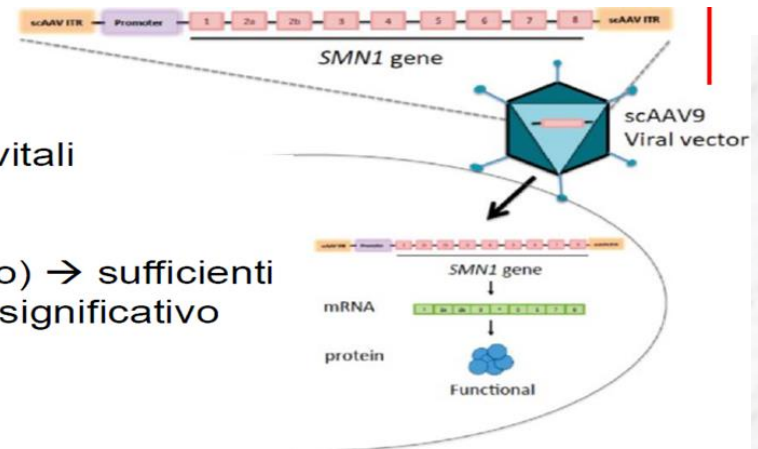


Approvato per pazienti:

→ **SMA di tipo 1 fino a 13,5 kg**
(= bambini di circa 3 anni d'età)

→ **pre-sintomatici con fino a 3 copie del gene SMN2.**

Prodotto: CD34+ autologhe



Efficacia:

- Inizio precoce: può salvare i motoneuroni vitali = non salva quelli morti.
- = ottimale con sintomi meno gravi (assenza di riflessi o tono muscolare ridotto) → sufficienti motoneuroni vivi per ricevere un beneficio significativo

Precauzioni:

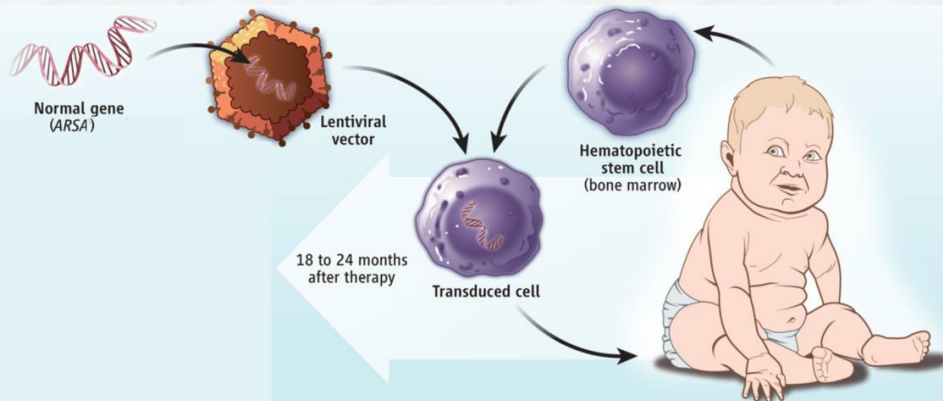
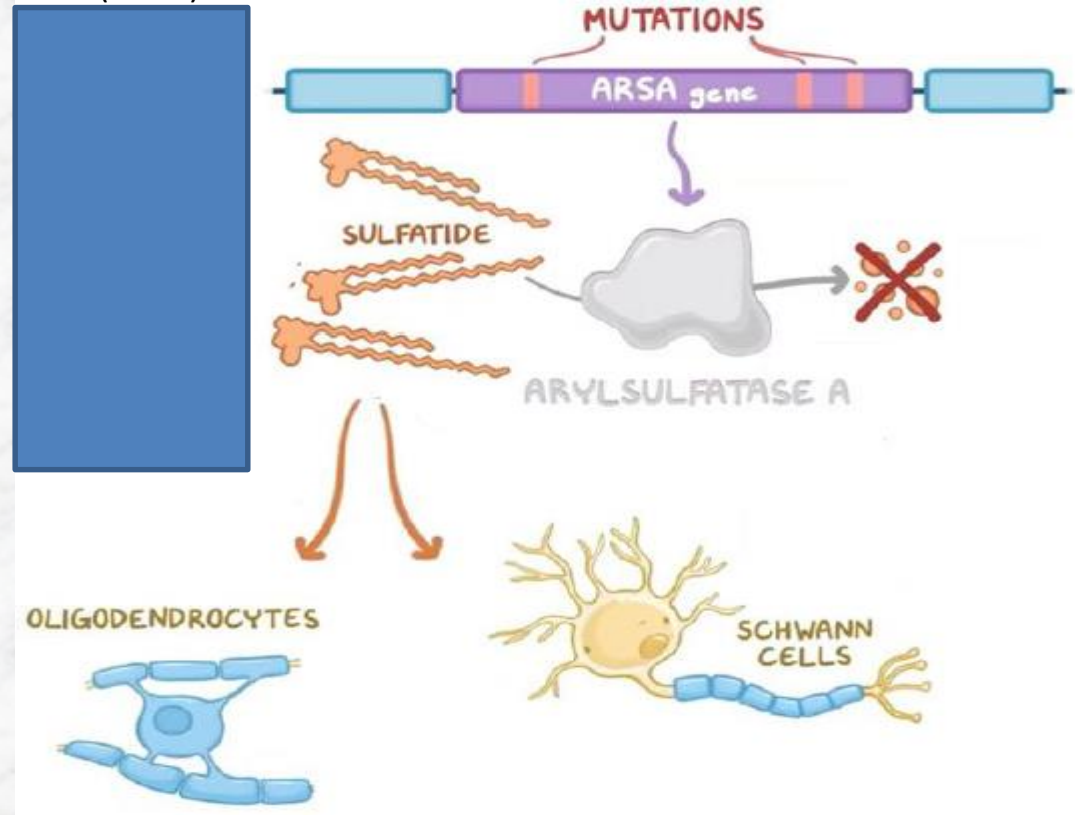
- Compromissione epatica
- Coagulazione anomala sangue
- Sodio (0,23% della dose giornaliera)

LIBMELDY: LEUCODISTROFIA METACROMATICA MLD

MALATTIA METABOLICA EREDITARIA RARA DEL SNC

Caratterizzata da mutazioni nel gene ARILSULFATASI A (ARSA)

Approvato
per: **Forme
Asintomatiche**
Giovani precoci/
Infantili tardive
e
**Forme iniziali
Giovani precoci**
(deambulazione
indipen e nessun
declino cognitivo)



Efficacia ottimale, minori sintomi tox

In attesa di autorizz. EMA

DIAGNOSI PRECOCE

per patologie neurodegenerative infantili

50% cause genetiche

25% esposizione in utero

20% sofferenza perinatale (parto distocitico, prematuro, gemellare; asfissia in utero, ...)

5% Altro → tumori, malattie infettivi, traumi, farmaci, stati carenziali, sostanze tossiche.

Programmi di screening neonatale

LUXTURNA Distrofia Retinica Ereditaria

Indicazione: **adulti e bambini con mutazioni nel gene RPE65**.

(es. **amaurosa congenita di Leber** → cecità infantile – 20-25% dei casi)

→ mutazioni impediscono di produrre una proteina necessaria per la visione (perdita della vista e conseguente cecità)

Principio attivo e meccanismo:

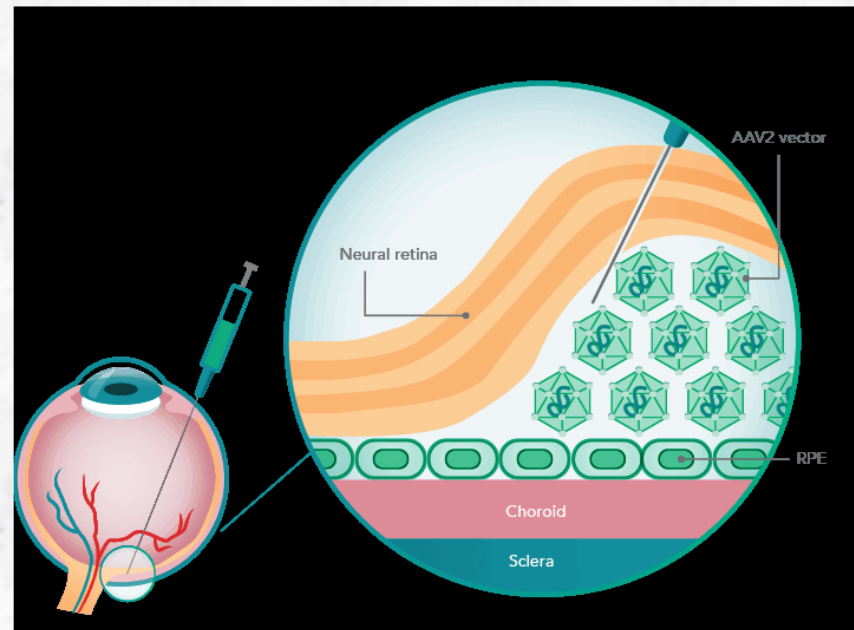
→ virus modificato che contiene copia funzionante del gene

Dopo iniezione, rilascia il gene nelle cellule della retina, (strato posteriore dell'occhio che rileva la luce)

Retina → produce la proteina necessaria per la visione.

RPE65

Malattia
rara



Farmaci ritirati dal mercato

GLYBERA

costi troppo elevati

Approvato per:

→ **Deficit familiare di lipasi lipoproteica (LPLD)**

Mancata digestione acidi grassi → pancreatiti, dolore addominale, spot pieni di grasso (↑ trigliceridi)

Efficacia ottimale

→ introducendo copie del gene rilevante per produrre indefinitamente la lipasi carente a tempo indeterminato → efficacia ad almeno 6 anni (follow-up)

NOVITA' in TERAPIA GENICA

1. EPIDERMOLISI BOLLOSA – bambini farfalla

Mutazione nel gene LAMB3:

Primo esempio 2006

Biopsia cutanea → olocloni → **Retrovirus + LAMB3** normale
→ Trasdote: generati lembi di pelle (500 cm²)
→ applicati a pt 36 ys
(attecchito; no tossicità; no alterazione di qualità/funzionalità pelle transgenica follow-up 10 ys)



Secondo esempio 2017

Biopsia cutanea → olocloni → **Retrovirus + LAMB3** normale
→ Trasdote: generati lembi di pelle (5 mesi → 0,82 m²)
→ applicati a pt 7 ys; 80% di cute compromessa

EPIDERMOLISI BOLLOSA DISTROFICA - LENTICOL-F TRIAL

Biopsia cutanea → fibroblasti → **lentivirus + COL7A1** wild-type
→ Iniezione intradermica
→ Fase I (UK) - efficacia/sicurezza

2. EMOFILIA (DISTURBO DELLA COAGULAZIONE)

Emofilia B

Assenza/diminuz del Fattore della coagulazione IX

AAV5 + gene funzionale (WT vs varianti)

Infusione del vettore virale

Fase III (Hope B) **AMT-061** (con fondi EMA e FDA)

Emofilia A

Assenza/diminuz del Fattore della coagulazione VIII

AAV6 + gene funzionale

Infusione del vettore virale

Fase I/II e Fase III **SB-525**

3. Patologie OCULARI e TG in vivo

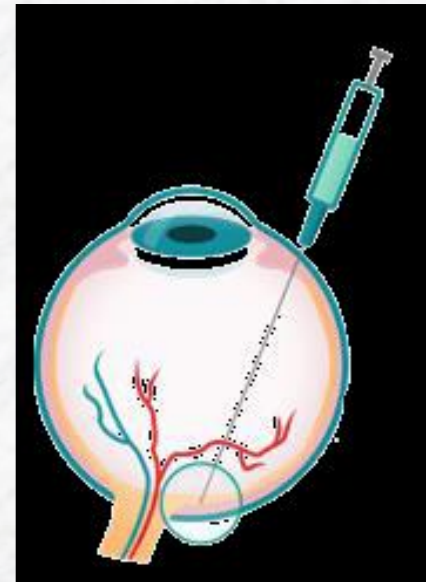
3A-Neuropatia Ottica ereditaria di Leber

Mutazioni nei geni mitocondriali ND1, ND6 o ND4: Cecità bilaterale

TG → vettore AVV2 per ND4 wt + sequenza target mitocondriale **GS010 in vivo**
Fase III 37 pts >>> miglioramento vis in entrambi gli occhi **attesa di EMA**

3B- Glaucoma (danno alle fibre nervose della retina > riduzione vista > cecità)

TG → vettore AVV2 * sequenza protrudina
modello animale promettente



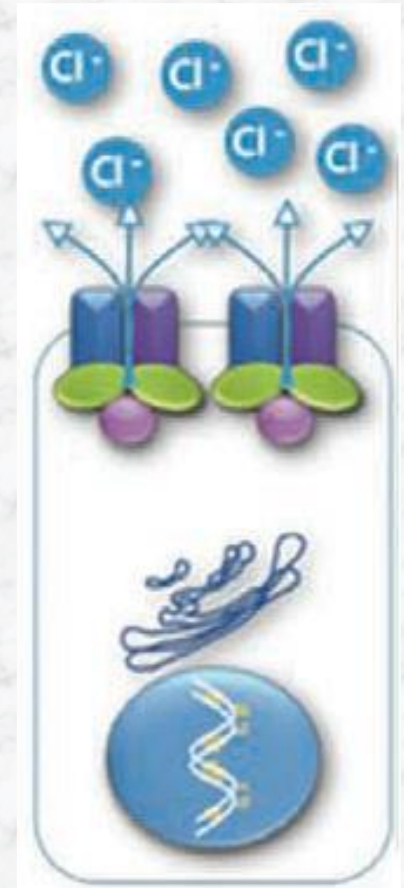
FIBROSI CISTICA

CFTR malattia con anomalie negli scambi elettrolitici
>> muco denso e viscoso (ostruzione dei dotti)
>> apparato respiratori, pancreas, fegato apparato riproduttivo

2000 diverse mutazioni (funzionalità ridotta o assente...**F508del** è la più frequente)

Strategie terapeutiche:

- AAV2
- Lentivirus
- Liposomi



ANEMIA FALCIFORME

Malformazione genetica ereditaria dell'emoglobina (mutazione)

Globuli rossi a forma di falce (mezzaluna)

Da Anemia cronica (eccessiva distruzione dei globuli rossi anomali)

LENTIGOBLIN

Fase I/II e Fase III

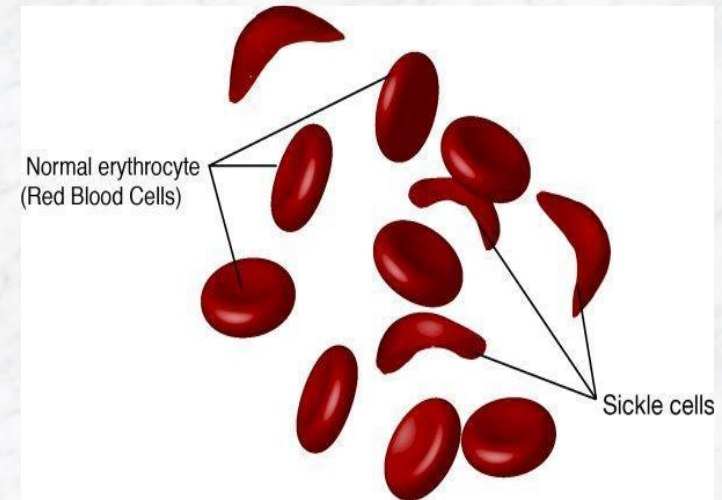
>prelievo e selezione delle cellule CD34+

>modificate Poi reinfuse nel paziente

>attraverso vettore virale

Febbraio 2021: sospese le sperimentazioni

RIDUZIONE/INTERRUZIONE DELLE TRASFUSIONI



La tecnologia CAR-T



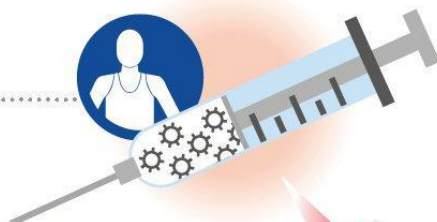
CHE COS'È

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

COME SI PROCEDE

Fase 1

Prelievo Linfociti T del paziente



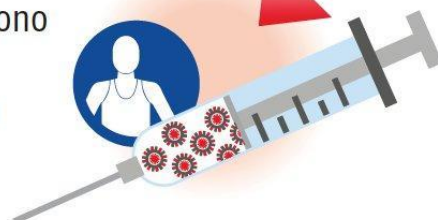
Fase 2

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



● adolescenti



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.

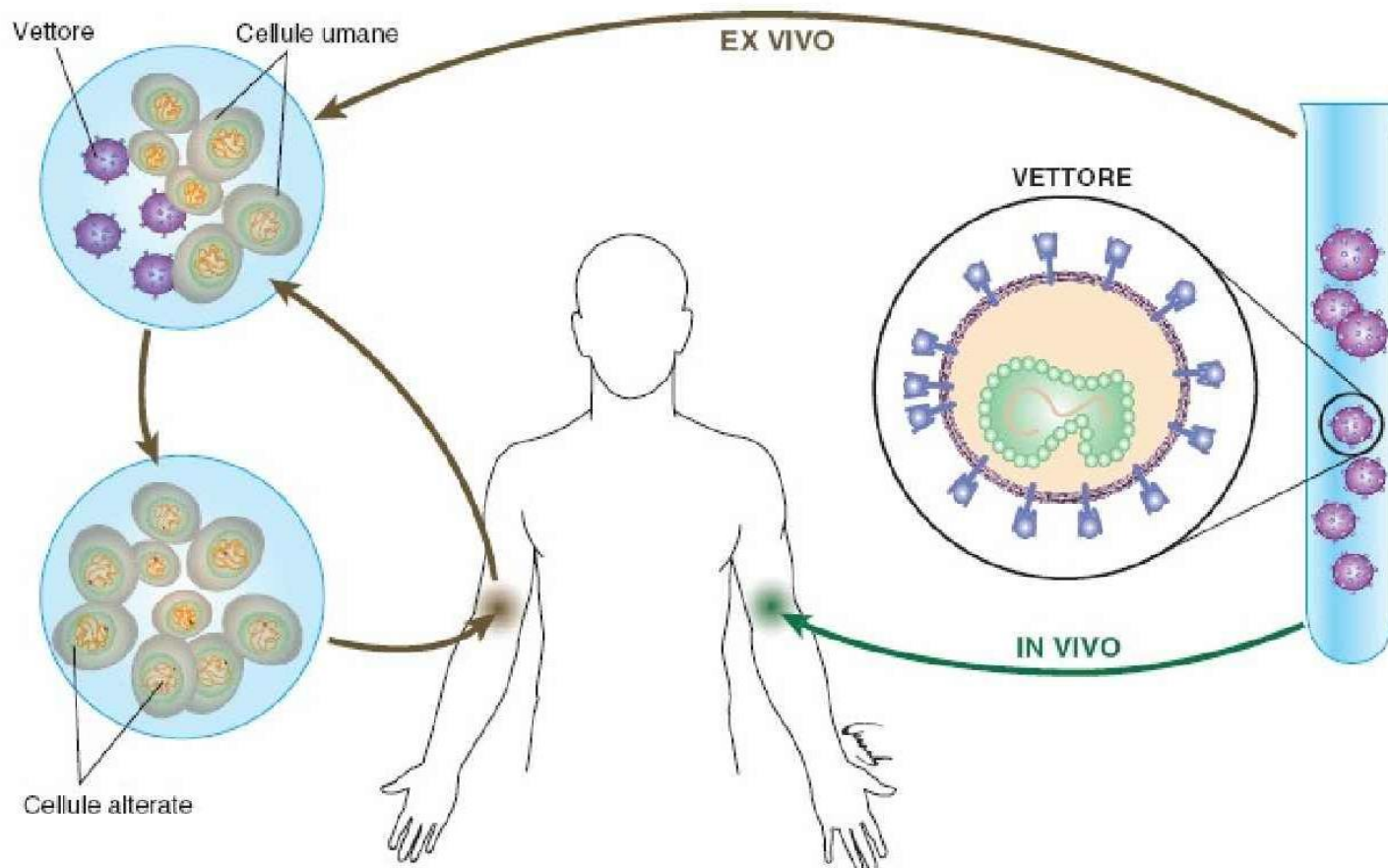
→ delle **cellule somatiche** = modifica il genoma dell'individuo ricevente e gli effetti della modifica sono limitati all'individuo e non si riscontrano nella prole. Oggi è la via più studiata e tentata.

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.

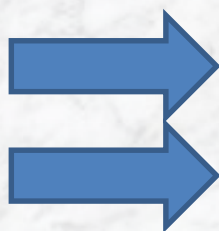
"in vivo" = viene attuata **in tutti quei casi in cui le cellule non possono essere messe in coltura o prelevate e reimpiantate**, come ad esempio quelle del cervello o del cuore e della maggior parte degli organi interni. **In questo caso il gene viene inserito nell'organismo tramite un apposito vettore**,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

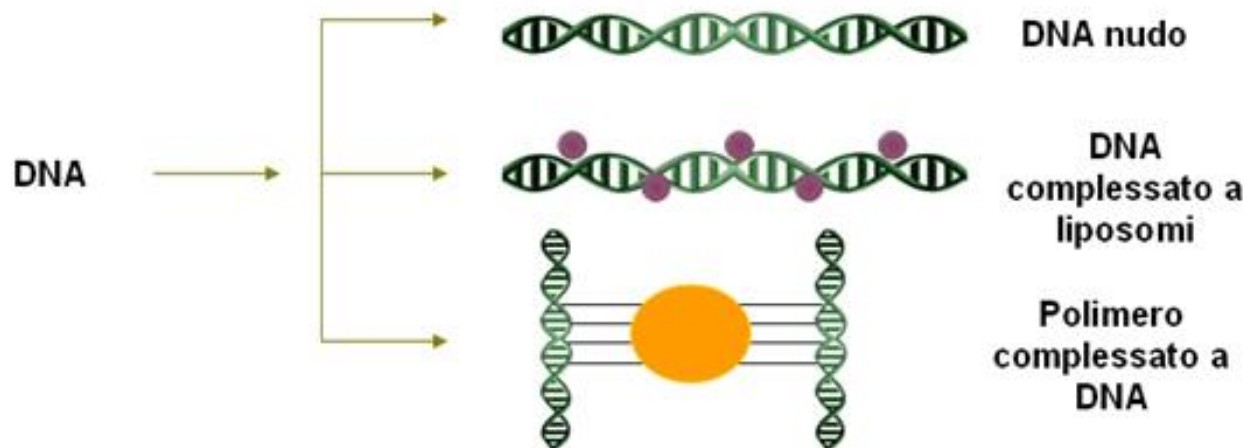
Vettori utilizzati per terapie geniche

Per trasferire il **transgene** nella cellula bersaglio è necessario disporre di un sistema in grado di veicolare 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



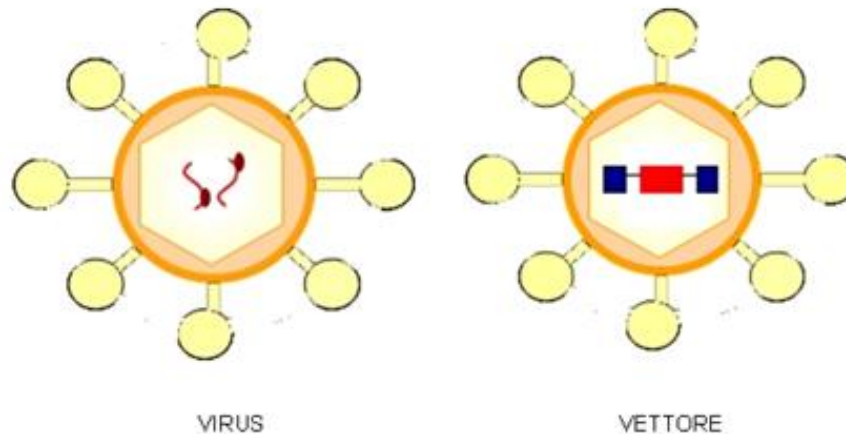
- **Vettori virali:** si basano sull'utilizzo di virus opportunamente modificati in modo tale da poter veicolare il genoma all'interno delle cellule bersaglio senza dare malattia (**retrovirali, adenovirali, herpes simplex, adenoassociati**)

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.

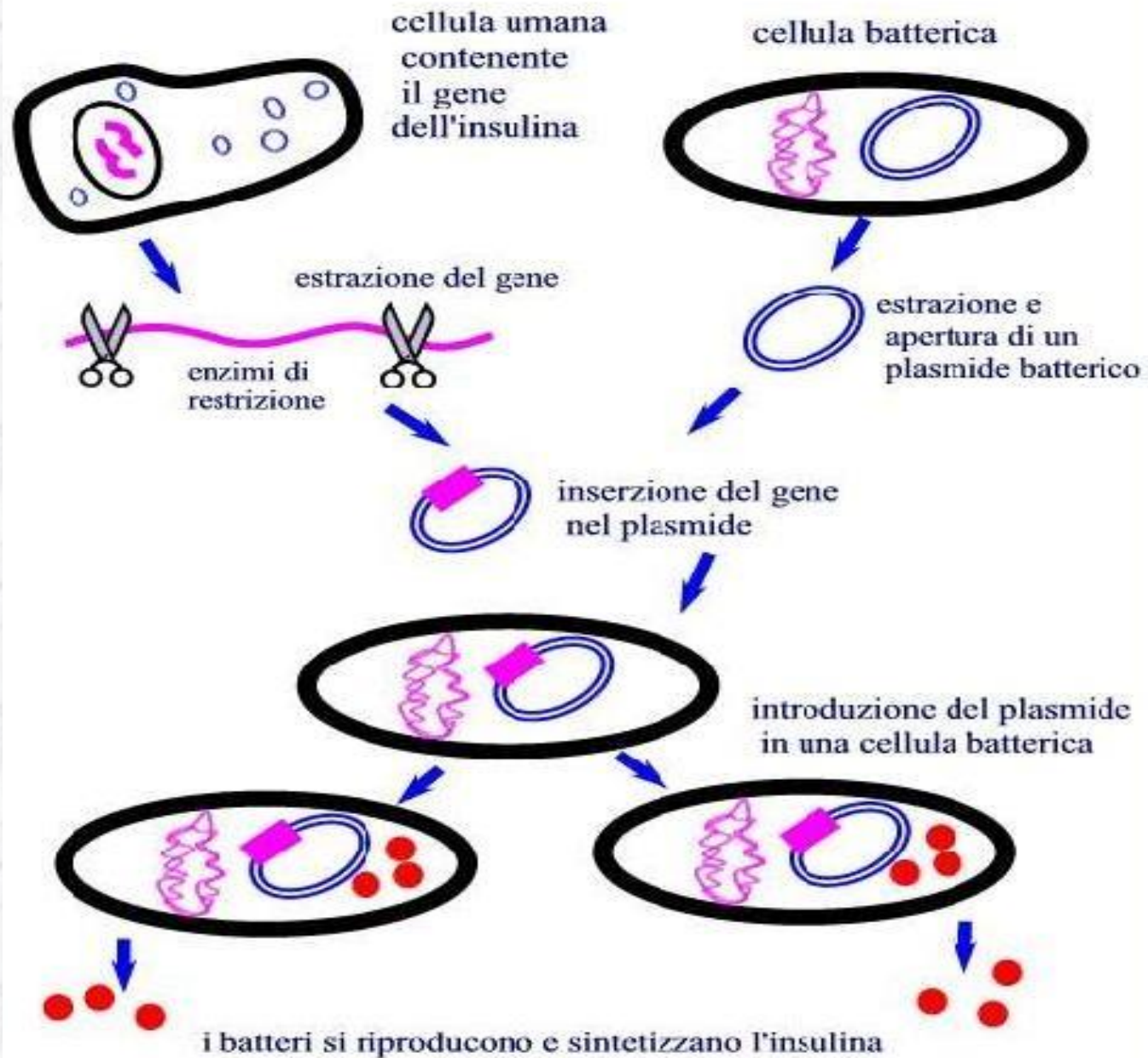
→ Questa tecnologia permette interventi mirati, che **modificano in modo specifico solo i geni dei caratteri su cui si vuole agire.**

→ 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):

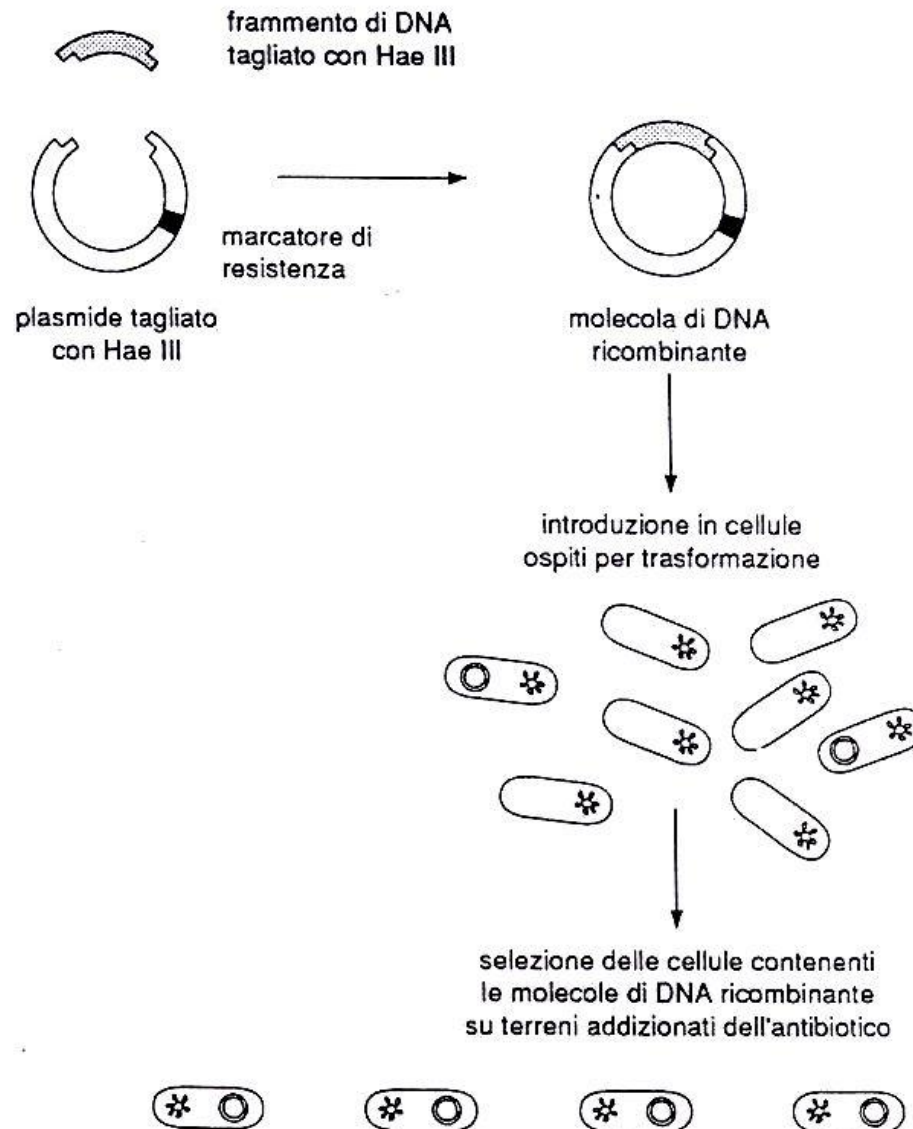
- **Trasmissione del gene inserito attraverso la replicazione** della cellula stessa (gene clonato)
- **Produzione di organismi geneticamente modificati** (transgenici)

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.

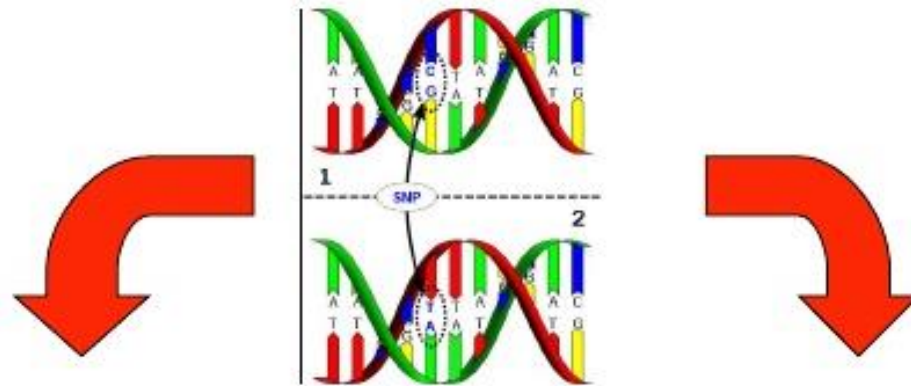
La variazione genetica può essere determinata da sostituzioni, delezioni o inserzioni di basi nel DNA e può riguardare regioni codificanti e regioni non codificanti.

→ 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

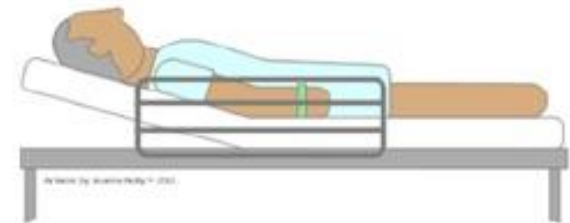
→ **e non silenti** quando si avrà un cambiamento del fenotipo, ad esempio si avranno **proteine modificate la cui funzione risulterà alterata.**

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

POLIMORFISMI E MUTAZIONI

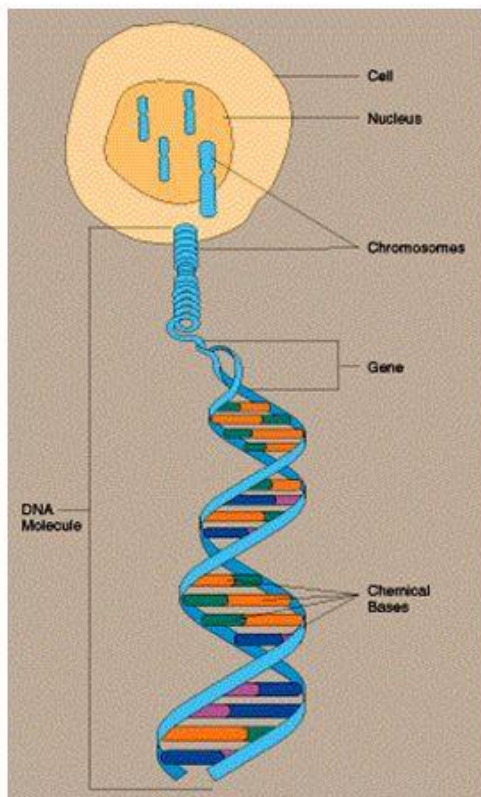


Alterazioni fenotipiche

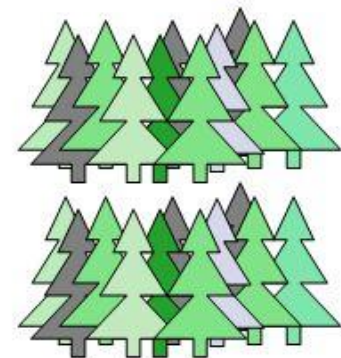


Alterazioni funzionali

Gli SNP (single nucleotide polymorphism)



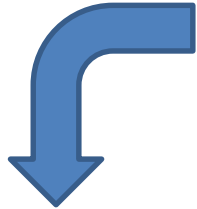
...CC **A** TTGAC...
...GG **T** AACTG...
...CC **G** TTGAC...
...GG **C** AACTG...



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)

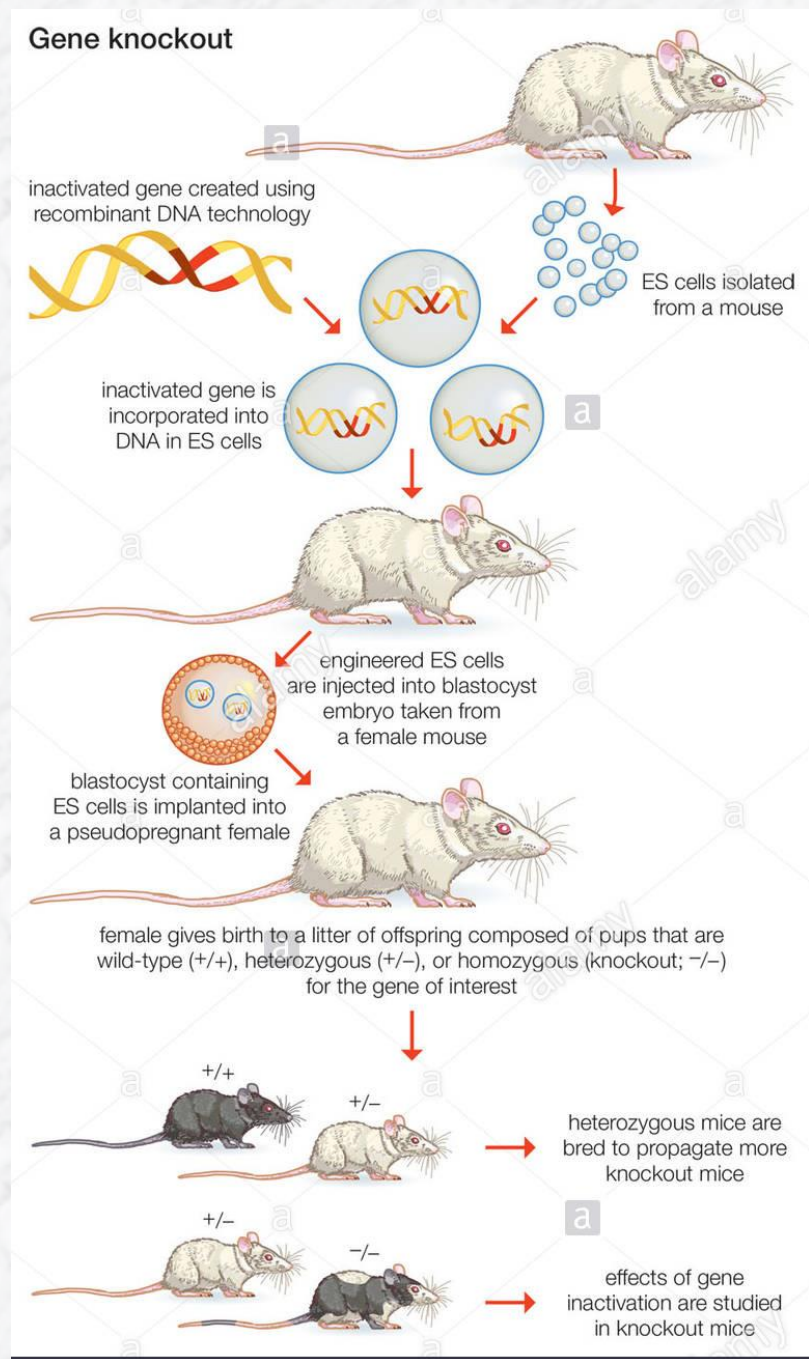
Studi di mutagenesi per comprendere le caratteristiche di una repressione genica

→ 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

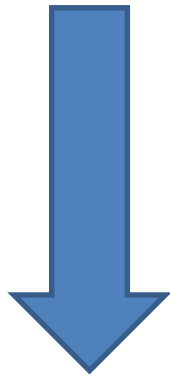
- ❖ Individuazione di geni a potenziale oncogenico e dei meccanismi che ne determinano l'espressione in cellule neoplastiche
- ❖ malattie ereditarie

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

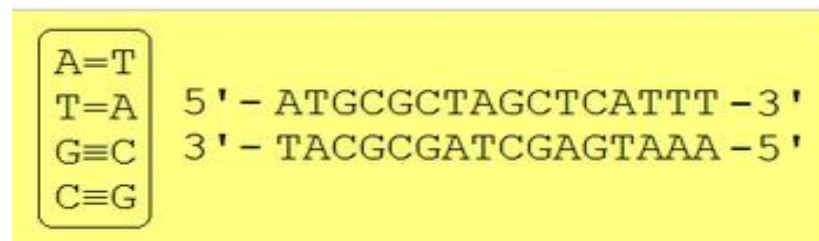
Impiego di modelli animali transegenici

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)**

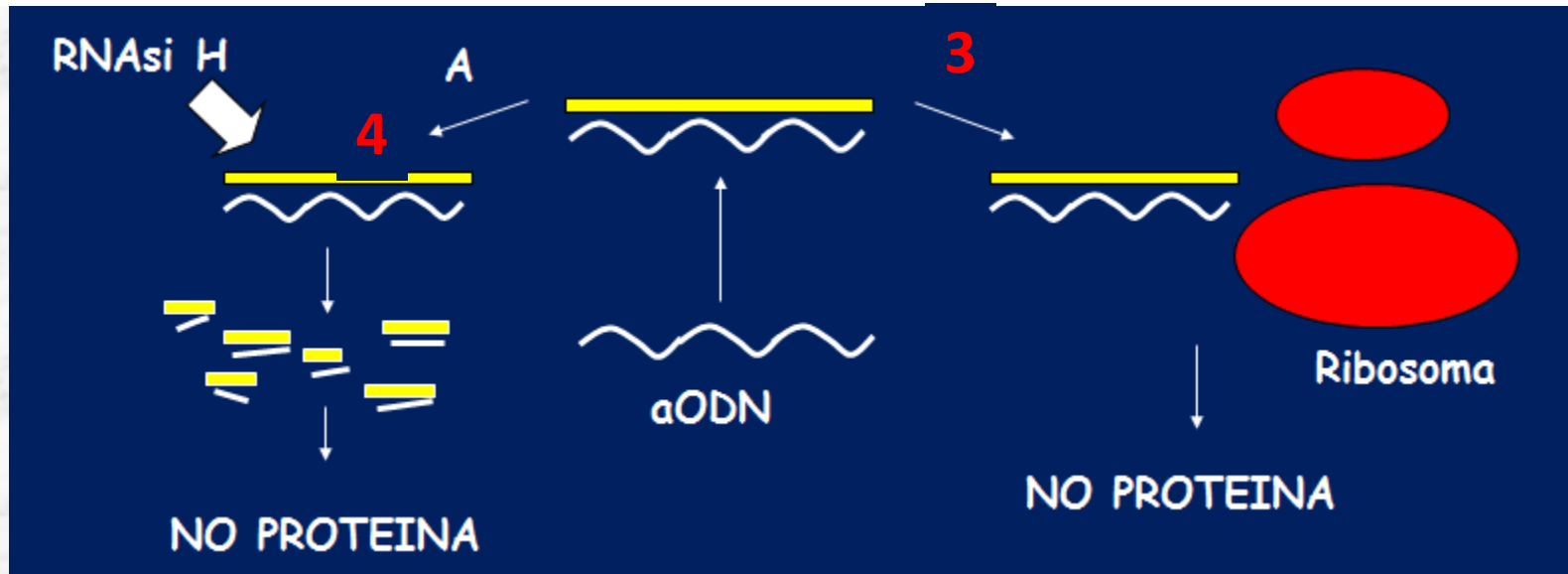
Tra i meccanismi principali d'azione degli aODN

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 γ , 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

STRIMVELIS PRIMO FARMACO APPROVATO In Italia 2016

Il successo é dimostrato dal fatto che nel 2023 l'83% dei pazienti che aveva fatto un singolo ciclo di terapia e' risultato curato e in ottime condizioni.

Prima Ex-vivo Gene Therapy italiana

Studio iniziato nel 2000, dal 2002 al 2009 Fase I e fase II

Dal 2010 al 2016 **uso compassionevole** in trial clinico Fase III

Nello trattamento si sono usate cellule arricchire di CD34+ autologhe

Mediante vettore virale geneticamente modificato

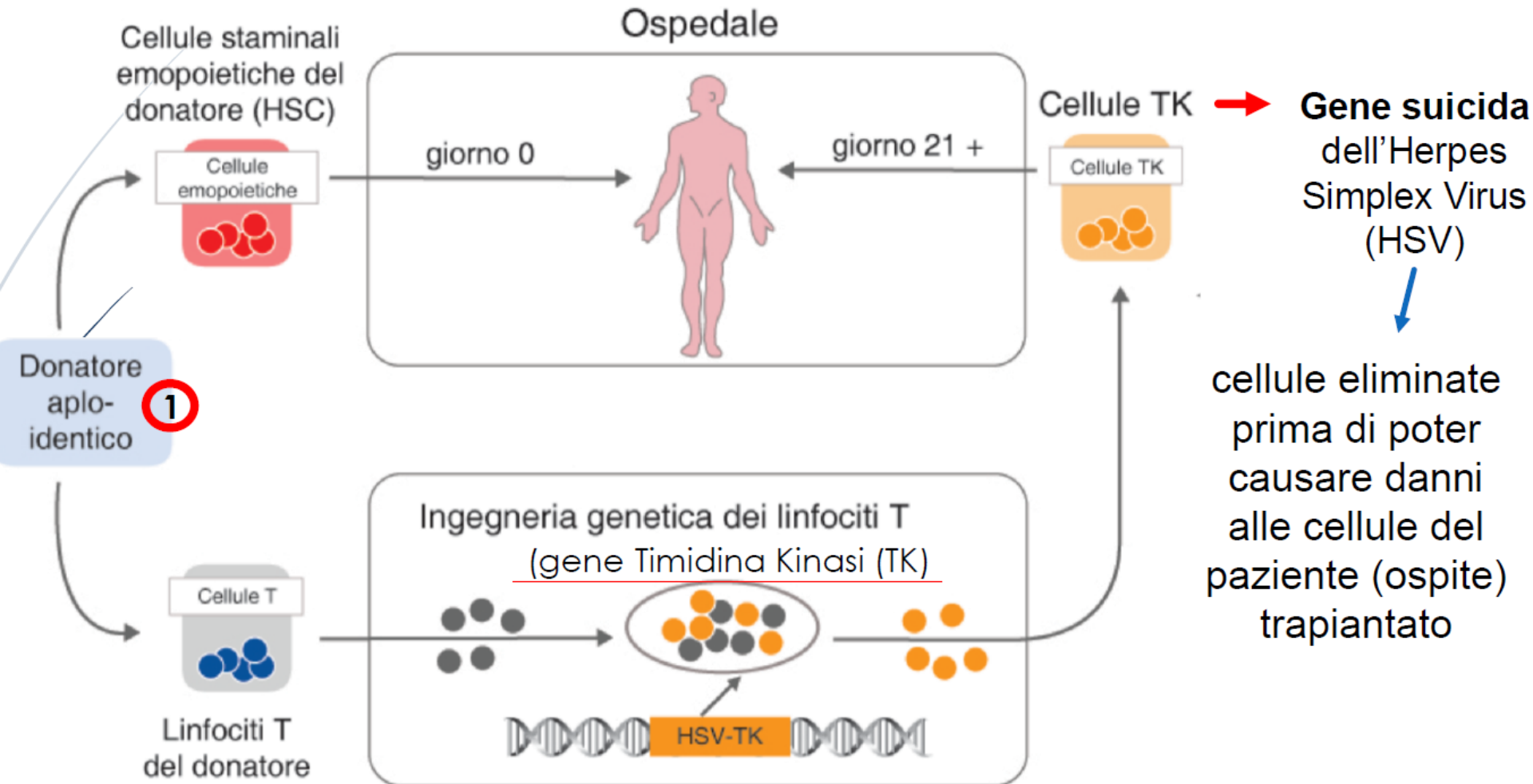
Aggiungendo cDNA per l'adenosina deaminasi (ADA)

Alla concentrazione di 10 Mil cellulare CD34+/ml

Via endovenosa

ZALMOXIS (2016):

«MALATTIA DEL TRAPIANTO CONTRO L'OSPITE»



Meccanismo d'azione di **Zalmoxis**

Indicazione: neoplasia ematologica in >18 anni
(fatto Trapianto con donatore compatibile)

Immunoricostituzione >> evitata la terapia immunosoppressiva
>> protezione dalle infezioni
>> protezione dalla recidiva

Controllo della malattia del trapianto verso l'ospite:
Cellule T ingegn con l'enzima virale



Profarmaco GANCICLOVIR attivato in forma tossica per il virus (trifosfato)
dall'enzima HSV-TK (enzima suicida)