

LA TERAPIA GENICA

Indice

1	In generale: l'idea e il metodo	3	
2	Principi su cui si basa il trasferimento genico	4	
3	Le strategie molecolari	5	
3.1	La terapia genica per le malattie infettive	6	
3.2	La terapia genica delle patologie ereditarie	6	
3.2.1	L'ADA	7	
3.2.2	L'ipercolesterolemia familiare	8	
3.2.3	La fibrosi Cistica	9	
3.3	La terapia genica dei tumori	9	
3.3.1	Il trasferimento genico nei linfociti che infiltrano il tumore	9	
3.3.2	L'immunoterapia adottiva mediante modificazione genetica delle cellule tumorali	10	
3.3.3	L'immunoterapia adottiva mediante modificazione genetica dei fibroblasti	10	
4	I vettori: caratteristiche e limiti	10	
4.1	I vettori retrovirali	11	
4.2	I vettori basati sul virus Herpes simplex (HSV)	11	
4.3	I vettori adenovirali	11	
4.4	I vettori basati su virus adeno-associati (AAV)	12	
4.5	Iniezione diretta o bombardamento con particelle (microiniezione-gene gun)	12	
4.6	Endocitosi mediata da recettori (complessi molecolari DNA-proteine)	12	
4.7	I liposomi	12	
5	I problemi tecnici della terapia genica	13	
6	Trial clinici in atto	13	
7	L'etica della terapia genica nell'uomo	13	
8	Linee guida per la sicurezza della sperimentazione in terapia genica	15	

Introduzione

La terapia genica consiste nella modificazione genetica delle cellule di un paziente al fine di combattere una malattia

La terapia genica, modificazione genetica delle cellule di un paziente, è un nuovissimo strumento della medicina che mira all'identificazione del gene difettoso che causa una patologia e quindi alla sua sostituzione con una copia che funzioni correttamente.

Il termine terapia genica ha un significato molto ampio in quanto può comprendere molte strategie differenti progettate per vincere o almeno alleviare una malattia. Per ottenere dei risultati positivi in terapia genica non basta quindi conoscere la sequenza completa del genoma umano, ma occorre comprendere a fondo i meccanismi con cui il gene difettoso produce i suoi effetti sull'organismo.

1 In generale: l'idea e il metodo

Nella definizione di terapia genica è implicita la possibilità di utilizzare diverse strategie molecolari. In particolare si può pensare sia all'inserimento di geni umani clonati sia di segmenti genici che possono derivare da altri genomi o venire direttamente sintetizzati in laboratorio. Normalmente in terapia genica, il trasferimento di geni è studiato per modificare geneticamente esclusivamente le cellule patologiche, ma per alcune malattie è più semplice modificare specificatamente le cellule sane, come quelle del sistema immunitario, in modo da determinare nel paziente una specie di vaccinazione. Inoltre il materiale genetico può venire trasferito direttamente nelle cellule nel corpo di un paziente (terapia genica in-vivo) oppure può essere trasferito nelle cellule precedentemente prelevate dal paziente e solo in seguito reintrodotte nel paziente stesso (terapia genica ex-vivo). Poiché le basi molecolari responsabili delle diverse malattie possono essere tra loro molto differenti, la terapia genica è particolarmente adatta a certi tipi di patologia tra i quali: - le malattie infettive (causate dall'infezione di un singolo agente patogeno sia virale sia batterico) - i tumori (causati dall'errata prosecuzione della divisione e della proliferazione cellulare a seguito dell'attivazione di un oncogene o dell'inattivazione di un oncosoppressore) - le malattie ereditarie (dovute a deficienze genetiche di un singolo prodotto genico o dall'errata espressione di un gene) - le malattie del sistema immunitario (che comprendono soprattutto le allergie, le infiammazioni e le malattie autoimmuni) Come si nota dai dati presentati dal biologo molecolare Inder M. Verma, un bambino su cento nasce con una malattia genetica grave che in genere si manifesta durante l'infanzia e che il più delle volte causa anomalie fisiche o mentali con sofferenza e morte precoce del soggetto. Poiché per la maggior parte delle oltre 400 malattie ereditarie sinora note purtroppo non si conoscono ancora terapie efficaci, non meraviglia che, dai primi sviluppi dell'ingegneria genetica, la ricerca medica si sia impegnata nel trovare una cura per le malattie genetiche me-

dante il reimpianto di geni "buoni" capaci di funzionare nelle cellule difettose in modo da correggere il difetto dell'organismo. L'idea della terapia genica è nata verso la fine degli anni '70 quando per la prima volta è stato clonato un gene. Il primo gene clonato era quello codificante per la b-globina, una proteina che da sola costituisce circa il 97% del globulo rosso maturo e che se viene espressa in modo errato o in quantità ridotta causa la talassemia. La possibilità di intervenire su questo gene in modo da ottenere globuli rossi sani e quindi non più talassemici ha dato il via ai primi numerosi tentativi di terapia genica. Purtroppo senza considerare che il globulo rosso è un tipo cellulare particolarmente inadatto ad una terapia genica. Infatti, poiché il globulo rosso adulto non ha il nucleo, non è in grado di tradurre il DNA del gene sano in una proteina sana per cui per curare la talassemia occorre trasfettare il gene della b-globina nelle cellule progenitrici del globulo rosso che sono però numericamente pochi e difficili da isolare. Inoltre l'emoglobina è una proteina espressa in modo strutturale dal globulo rosso e per correggere la talassemia occorre raggiungere altissimi livelli di espressione del gene inserito. La principale motivazione per sviluppare la terapia genica consiste proprio nella necessità di curare malattie per le quali non si conoscono ancora terapie efficaci. Una volta caratterizzato il gene che determina una malattia, si possono usare strumenti genetico-molecolari che ne permettano il clonaggio, il trasferimento all'interno del nucleo di cellule riceventi dette anche cellule bersaglio e quindi l'espressione in queste cellule della molecola per cui il gene codifica. Perché gli esperimenti di terapia genica possano avere successo e cioè siano in grado di riparare in modo definitivo il difetto cellulare senza che il paziente debba sottoporsi contemporaneamente ad altri trattamenti o a trattamenti ripetuti, è necessario approfondire le conoscenze bio-molecolari e acquisire strumenti e tecnologie che consentano di: - ottenere una quantità notevole del gene normale da impiantare e comprenderne bene i meccanismi cellulari che ne regolano l'espressione - mettere a punto un metodo efficiente per introdurre i geni desiderati nei cromosomi delle cellule bersaglio in modo tale che una volta inte-

grati essi siano stabilmente espressi - costruire o conoscere vettori capaci di trasportare i geni di ricambio solo nelle cellule dove è necessario senza intaccare gli altri tessuti - poter introdurre i geni di ricambio in una proporzione significativa di cellule bersaglio: in modo da garantire un'efficacia medica significativa - realizzare questi interventi in utero o durante i primissimi mesi dopo la nascita di un individuo ovvero prima che la malattia porti all'organismo dei danni che spesso sono irreparabili. I primi esperimenti sono stati condotti agli inizi degli anni '90 ed erano esperimenti di gene-marking nei quali si provava a vedere se si poteva inserire un gene esogeno nelle cellule ex-vivo studiando quante cellule erano effettivamente in grado di integrare il costrutto, quanto questo veniva espresso e per quanto tempo.

2 Principi su cui si basa il trasferimento genico

La terapia genica classica normalmente richiede il trasferimento efficiente di almeno un gene, precedentemente clonato, in cellule patologiche in cui i geni introdotti possano venire espressi in maniera inalterata ed a livelli quantitativamente adeguati. Almeno in teoria, esistono numerosi e differenti metodi fisico-chimici e biologici utilizzabili per trasferire geni esogeni in cellule umane. Le dimensioni dei frammenti di DNA che possono essere trasferiti sono però piuttosto limitate e molto spesso il trasferito non è un gene convenzionale, ma solo un frammento in cui risiede l'attività principale della molecola deficitaria. Ad esempio per ridurre le dimensioni del DNA da inserire si può eliminare gli introni dal gene e trasferire solo la sequenza di DNA codificante per gli esoni in ordine, si fa cioè in modo che una sequenza di cDNA contenga la sequenza codificante completa del gene venga fiancheggiata da appropriate sequenze di regolazione, capaci di assicurare elevati livelli di espressione, quali ad esempio un forte promotore virale. Dopo il trasferimento, i geni inseriti possono integrarsi nei cromosomi della cellula oppure rimanere sotto forma di elementi genetici extracromosomici detti più semplicemente epi-

somi. Il vantaggio di integrare il gene in un cromosoma consiste nel fatto che il gene può essere perpetuato durante la replicazione cromosomica che segue la divisione cellulare. In questo caso, tutte le cellule figlie della cellula che ha integrato il gene esogeno nel cromosoma contengono il gene introdotto artificialmente e così si riesce ad ottenere nell'individuo un'espressione stabile a lungo termine del prodotto che consente di mantenere nel tempo l'efficacia della terapia. Nei tessuti composti da cellule in attiva divisione il trucco consiste nel coinvolgere le cellule staminali (una piccola popolazione di precursori indifferenziati che da origine alle cellule differenziate del tessuto) infatti queste produrranno le cellule del tessuto maturo e le produrranno tutte con il gene esogeno attivo. Tuttavia l'integrazione genica nel cromosoma ha anche degli svantaggi perché spesso l'inserimento del gene nel cromosoma è del tutto casuale e quindi la localizzazione del gene inserito può variare da cellula a cellula. In molti casi il gene inserito può non essere espresso perché si è integrato in una regione di eterocromatina altamente condensata che ne impedisce la trascrizione. In altri casi l'evento di inserzione può determinare la morte della cellula ospite, ad esempio se l'inserimento avviene in una regione particolarmente importante e provoca l'inattivazione di un altro gene indispensabile per la sopravvivenza cellulare. Una preoccupazione maggiore riguarda la possibilità che per un evento di ricombinazione che sia capace di disturbare i normali schemi di espressione dei geni che controllano la divisione e la proliferazione cellulare (ad esempio l'inattivazione di un oncosoppressore o l'attivazione di un oncogene), in una delle cellule modificate col gene esogeno, insorga un tumore. La terapia genica ex-vivo offre tuttavia la possibilità di selezionare le cellule in cui l'integrazione abbia avuto successo, di amplificarle in coltura e di analizzarne i fenotipi per evidenziare una qualsiasi trasformazione neoplastica prima che le cellule vengano ritrasferite nel paziente. Alcuni sistemi di trasferimento genico sono invece progettati per inserire i geni dentro le cellule dove essi rimangono come elementi extracromosomici e possono essere espressi ad elevati livelli. Se si vuole trasferire come episoma un gene in cellule

che si dividono attivamente, il gene esogeno introdotto perderà nel tempo efficacia perché non potrà segregare in modo equivalente nelle cellule figlie e quindi la sua espressione a lungo termine risulterà inficiata. Di conseguenza la realizzazione di una cura per una malattia genica appare una meta difficile da raggiungere, infatti saranno necessari trattamenti ripetuti capaci di assicurare un adeguato trasferimento del gene. In alcuni casi tuttavia per la terapia genica può non essere necessaria un'espressione stabile a lungo termine, ad esempio nella terapia genica contro il cancro spesso si preferisce trasferire nelle cellule un gene in grado di uccidere selettivamente le cellule tumorali e quindi, una volta eliminato il cancro, la presenza del gene terapeutico non è più necessaria.

3 Le strategie molecolari

La terapia genica si basa sostanzialmente su quattro differenti strategie. In primo luogo si può incrementare la dose di un gene deficitario aggiungendone delle copie. Ad esempio per le malattie causate dalla perdita di funzione di un gene, l'introduzione di copie aggiuntive di quel gene sano può aumentare la quantità del prodotto genico a livelli sufficienti a ripristinare il fenotipo normale. Questo metodo è stato applicato in particolare per le patologie autosomiche recessive in cui anche livelli modesti di espressione del gene introdotto possono portare ad una totale guarigione. Le malattie con eredità dominante sono invece molto meno adatte a questo trattamento sino a quando non si riuscirà a raggiungere per i geni esogeni livelli di espressione pari almeno al 50% della quantità del gene normalmente espressa in un individuo sano. Per determinate patologie invece si può voler uccidere in modo mirato le cellule patologiche. Solitamente questo approccio è molto diffuso nella terapia genica contro il cancro. Alcuni geni infatti possono venire indirizzati verso le cellule tumorali e poi fatti espressi in modo da causare la morte della cellula che appunto li esprime. L'uccisione diretta delle cellule è possibile se questi geni codificano ad esempio per una tossina letale (detto gene suicida)

o per un pro-farmaco, cioè una sostanza in grado di conferire suscettibilità a un determinato farmaco che quindi se somministrato uccide solo la cellula con dentro il pro-farmaco. Viceversa si può anche tentare un'uccisione indiretta delle cellule tumorali utilizzando ad esempio geni immunostimolatori capaci di indurre o aumentare una risposta immunitaria contro la cellula cancerogena. Altrimenti si può pensare di correggere selettivamente la mutazione che rende il gene non funzionante, ma a causa di varie difficoltà di ordine pratico, questo metodo non trova ancora applicazione anche se è, almeno in teoria, già attuabile sia a livello della sequenza di DNA di un gene sia a livello del suo trascritto di RNA messaggero. Oppure si potrebbe inibire selettivamente l'espressione di un gene. Ad esempio, se cellule malate esprimono un nuovo prodotto genico o comunque una molecola alterata o aberrante, si può bloccarne direttamente il DNA, l'RNA o la proteina. Nella terapia genica vengono utilizzati due metodi principali per il trasferimento di geni. Nel trasferimento ex-vivo si comincia col trasferire geni clonati in cellule in coltura. Le cellule che esprimono il gene vengono poi selezionate, espanse mediante coltura in vitro ed infine reintrodotte nel paziente. Per evitare che queste cellule vengano rigettate dal sistema immunitario, normalmente si utilizzano cellule autologhe: le cellule inizialmente vengono espianate dal paziente da trattare e fatte crescere in coltura prima di essere reintrodotte nello stesso individuo. Chiaramente, questo metodo è applicabile solo a tessuti che possano 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 quelle della pelle). Nel trasferimento in-vivo invece i geni clonati vengono trasferiti direttamente nei tessuti del paziente. Questa è l'unica possibilità di terapia genica per tutti quei tessuti in cui le singole cellule non possono essere coltivate in vitro in numero sufficiente (come ad esempio le cellule cerebrali) e/o in cui le cellule coltivate non possono essere estratte o reimpiantate nel paziente. Non essendoci un modo per selezionare e amplificare le cellule che acquisiscono ed esprimono

il gene esogeno come invece si può fare *ex vivo*, il successo di questo metodo dipende fortemente dall'efficienza generale del trasferimento e dell'espressione del gene.

3.1 La terapia genica per le malattie infettive

Le metodologie della terapia genica usate nel trattamento delle malattie infettive hanno il fine di indurre una risposta immunitaria specifica contro le cellule infette o comunque la loro uccisione mirata. Queste metodologie sono dirette ad interferire col ciclo vitale degli agenti infettivi in modo da ridurre la possibilità che questi riescano ad intraprendere nuovamente un'infezione produttiva. Le principali infezioni su cui si cerca di intervenire sono quelle che con le terapie convenzionali non hanno dato segnali positivi di guarigione come le malattie protozoarie e la malaria. Del resto gli attuali tentativi di terapia genica delle malattie infettive sono soprattutto diretti al trattamento dei pazienti affetti da AIDS. L'agente infettivo di questa patologia è dato da una classe di retrovirus nota come HIV capace di infettare i linfociti T helper (TH). Sono due le caratteristiche dell'HIV capaci di renderlo così letale: esso uccide i linfociti T helper rendendo quindi i pazienti suscettibili a moltissime altre infezioni (che a loro volta possono essere letali) ed inoltre il provirus tende a persistere in uno stato latente e viene attivato improvvisamente così che la terapia farmacologica convenzionale ne resta molto complicata. Inoltre il genoma dell'HIV tende a mutare in continuazione ed ad una velocità molto elevata per cui è difficile stabilire un vaccino efficace. In teoria si possono immaginare varie strategie di terapia genica per trattare l'AIDS. Le cellule infettate possono venire uccise direttamente mediante l'inserimento di un gene codificante per una tossina o indirettamente mediante il potenziamento della risposta immune. Ad esempio si può considerare il trasferimento di un gene codificante per un antigene dell'HIV come la proteina gp120 e la sua espressione nel paziente al fine di aumentarne la risposta immunitaria verso il virus. Altrimenti si può pensare di interferire con il ciclo vitale dell'agente infettivo. E'

disponibile un'ampia varietà di strategie progettate per interferire con il ciclo vitale dell'HIV, sostanzialmente si può immaginare di interferire mediante il blocco dell'infezione virale. L'HIV infatti infetta i linfociti T mediante il legame della proteina gp120 del virus con il recettore di membrana CD4 dei linfociti. Il trasferimento di un gene che codifichi una forma solubile dell'antigene CD4 nei linfociti T porterebbe del CD4 libero nel circolo sanguigno. Se i suoi livelli fossero sufficientemente alti, si potrebbe immaginare che questo riesca a competere per la gp120 virale e cioè che il CD4 solubile leghi tutta la gp120 virale impedendole quindi di legare il CD4 presente sulla membrana del linfocita T.

3.2 La terapia genica delle patologie ereditarie

Le patologie ereditarie su cui si può ipotizzare un intervento di terapia genica sono essenzialmente quelle legate al difetto di un singolo gene dette monogeniche, tra cui l'ipercolesterolemia familiare che è dovuta ad un difetto nell'espressione del recettore delle LDL nel fegato. Il trial clinico di questa malattia è stato tra i primi avviati ed è ancora in atto. Dopo una parziale epatectomia, gli epatociti estratti sono stati coltivati *in vitro* e quindi trasfettati con il recettore per le LDL e un gene che veicolasse la resistenza ad un antibiotico, l'igromicina. Le cellule del fegato che durante la trasfezione avevano incorporato il vettore sono state poi selezionate con l'igromicina e quindi reimmesse nel fegato del paziente mediante iniezione intravena. Nel fegato si è potuta così indurre una certa espressione di recettore per le LDL che è in grado di supplire almeno in parte il deficit della malattia. Un'altra patologia che si presta bene all'utilizzo della terapia genica è il deficit di adenosin deaminasi (ADA). La mancanza di questo enzima porta ad una devastante immunosoppressione e basta anche pochissimo enzima a ridurre drasticamente gli effetti dannosi del deficit. Proprio per questo motivo una malattia di per se stessa terribile come questa è diventata il modello per la terapia genica. Del resto il trattamento non porta comunque alla completa indipendenza del paziente che deve comunque

ricorrere alla terapia sostitutiva. Diverse malattie genetiche sono suscettibili in grado differente a terapia genica. Le comuni malattie genetiche non mendeliane possono implicare una complessa correlazione tra loci genetici e/o fattori ambientali differenti per cui le varie strategie di terapia genica possono essere non facili. Le patologie determinate da un unico gene sono invece i candidati più ovvii per la terapia genica. Grazie al clonaggio posizionale ed alle altre strategie di identificazione dei geni si stanno isolando e caratterizzando un numero sempre maggiore di geni responsabili di patologie di questo tipo. Tuttavia, le diverse modalità di patogenesi fanno sì che alcune di queste malattie siano più adatte di altre ad essere trattate con tecniche di terapia genica. Tra le malattie ereditarie quelle ad ereditarietà recessiva concettualmente sono le più facili da trattare con la terapia genica. Le affezioni in cui la malattia è il risultato di una deficienza di uno specifico prodotto genico generalmente sono le più idonee a questo tipo di terapia: l'introduzione di un allele normale con un'elevata espressione dovrebbe essere sufficiente a far superare il deficit. Le malattie ad eredità recessiva costituiscono candidati particolarmente interessanti per la terapia genica perché le mutazioni determinano quasi sempre perdita di funzione. I soggetti ammalati presentano un'espressione deficitaria di entrambi gli alleli per cui il fenotipo patologico è dovuto all'assenza completa o quasi della normale espressione genica. Gli eterozigoti, invece, hanno circa il 50% del prodotto genico normale e solitamente sono asintomatici. Inoltre, si riscontra in alcuni casi un'ampia variazione dei normali livelli di espressione genica, per cui una percentuale relativamente bassa dei normali livelli di espressione può essere sufficiente a restaurare il fenotipo normale. Spesso si osserva anche che in queste malattie la gravità è inversamente proporzionale alla quantità del prodotto che viene espresso. Di conseguenza, anche se l'efficienza del trasferimento genico è bassa, anche modesti livelli di espressione del gene introdotto possono determinare un drastico miglioramento a livello del fenotipo. Benché le malattie ad eredità recessiva siano, almeno in teoria, adatte a una terapia genica basata sull'aggiunta di

copie geniche, certe malattie lo sono meno di altre. Oltre al problema dell'accessibilità ai tessuti interessati dalla patologia, vi sono anche altre ragioni in grado di ostacolare la terapia genica. Un esempio è fornito dalla β -talassemia che deriva dalla mutazione del gene della globina detto HBB. Questa è una grave malattia che colpisce centinaia di migliaia di persone in tutto il mondo ed è piuttosto diffusa in Italia. Ad una valutazione superficiale sembrerebbe un ottimo candidato per la terapia genica infatti il gene dell'HBB è molto piccolo ed è stato ampiamente caratterizzato, la malattia è ad ereditarietà recessiva ed interessa le cellule del sangue. Un iniziale tentativo di terapia genica per questa malattia fu iniziato nel 1980 e fallì soprattutto per l'inefficienza del trasferimento genico e della scarsa espressione dei geni della β -globina introdotti. Anche se ora si sa molto di più su come questi geni siano prodotti non si sono più fatti esperimenti di terapia genica. Permane infatti il problema del controllo dell'espressione genica dopo l'inserimento del gene normale della β -globina nelle cellule ospiti: la quantità di β -globina deve infatti essere uguale alla quantità di α -globina. Se si produce una delle due forme più dell'altra si crea uno squilibrio tra le due catene di globina che determina il fenotipo dell' β -talassemia.

3.2.1 L'ADA

L'ADA o adenosina deaminasi è un enzima coinvolto nel salvataggio delle purine nel percorso di degradazione degli acidi nucleici ed è un enzima indispensabile in molti tipi cellulari. La sua carenza causa una patologia recessiva molto rara che ha effetti molto seri sui linfociti T, una delle principali classi di cellule del sistema immunitario. I pazienti con questo deficit detti ADA-soffrono infatti di una grave e complessa immunodeficienza. Questa patologia è adatta per la terapia genica per varie ragioni: il gene ADA è piccolo ed era già stato clonato prima del 1990, le cellule bersaglio sono i linfociti T che sono facilmente ottenibili dal paziente (basta un prelievo di sangue) e facilmente coltivabili in modo da permettere una terapia genica ex-vivo. Inoltre l'espressione normale di questo gene non

è rigidamente controllata ma può variare negli individui sani da un livello del 10 ad uno del 5000% del valore medio. Il primo successo si ebbe con un trial clinico iniziato il 14 settembre 1990 su una paziente, Ashanthi DeSilva, che aveva solo 4 anni. In questo caso si osservò che il trasferimento di geni ADA normali nei linfociti T di un paziente ADA- determina la restaurazione del fenotipo normale. Per questa patologia esistono anche trattamenti alternativi: quello di elezione è il trapianto allogenico di midollo osseo che porta alla guarigione nell'80% dei casi, ma occorre un donatore di midollo HLA compatibile. Dove il trapianto non è attuabile si può anche ricorrere alla sostituzione enzimatica, che consiste in iniezioni intramuscolari di ADA coniugata a polietilenglicole (PEG) da effettuarsi con scadenza settimanale. Il PEG serve a stabilizzare l'enzima permettendogli di rimanere attivo nel corpo umano per diversi giorni. Del resto la terapia enzimatica non fornisce una completa ricostruzione della capacità immunitaria e quindi l'attesa di vita del paziente è comunque minore infatti i linfociti T sono necessari per la realizzazione di risposte immuni efficaci contro i microrganismi invasori e la prevenzione dei tumori. La terapia dell'ADA implica essenzialmente quattro passaggi: - Il clonaggio del gene sano dell'ADA in un vettore retrovirale - Il trasferimento del ricombinante ADA nei linfociti T ADA- del paziente - L'identificazione dei linfociti diventati ADA+ e la loro espansione numerica in coltura - Il reimpianto di queste cellule nel paziente Poiché i linfociti T hanno un periodo di vita limitato nel tempo è necessario ripetere la terapia ogni uno o due mesi per questo motivo le ricerche sono ora orientate a trasferire il gene dell'ADA nelle cellule del midollo osseo. La terapia sulle cellule del sangue è infatti un trattamento e non una cura che invece richiederebbe proprio il trasferimento del gene dell'ADA nelle cellule staminali del midollo osseo del paziente. Il problema di quest'approccio è che le cellule staminali del midollo osseo sono molto difficili da isolare benché ormai siano possibili degli arricchimenti utilizzando anticorpi monoclonali come quello che riconosce il CD34 (un recettore selettivamente presente nella popolazione cellulare totipotente

del midollo osseo). La frequenza delle infezioni dei pazienti trattati con terapia genica è sicuramente diminuita, ma l'efficacia della terapia genica da sola è ancora difficile da dimostrare perché Ashanthi e gli altri pazienti sinora trattati con terapia genica hanno anche ricevuto iniezioni intramuscolari di enzima PEG-ADA.

3.2.2 L'ipercolesterolemia familiare

L'ipercolesterolemia familiare (FH) è una patologia determinata da una deficienza ad ereditarietà dominante dei recettori per le lipoproteine a bassa densità (LDL), che normalmente vengono sintetizzati nel fegato. La patologia è caratterizzata da un'affezione prematura delle arterie coronarie. Circa il 50% dei maschi omozigoti affetti, se non viene curato, muore entro i 60 anni. Poiché questa patologia causata da un unico gene è piuttosto frequente, occasionalmente si individuano degli omozigoti. Gli omozigoti presentano un esordio molto precoce della malattia che si presenta con una gravità maggiore e porta comunemente a morte per infarto del miocardio nella seconda infanzia. La terapia genica per FH è stata tentata per la prima volta su una donna di 28 anni omozigote per la malattia. La paziente aveva già subito un infarto del miocardio all'età di 16 anni e a 26 anni si era sottoposta ad un intervento di by-pass alle arterie coronarie. Il fegato, essendo un organo interno, può non sembrare un organo d'elezione per la terapia genica e la principale popolazione di cellule che lo costituisce, gli epatociti, sono altamente differenziati e quindi refrattari all'infezione del retrovirus. Tuttavia, gli epatociti possono venire anche coltivati in vitro e trattati in modo da divenire suscettibili all'infezione virale. La terapia genica ha comportato la rimozione chirurgica di una porzione del lobo sinistro del fegato della paziente, la disgregazione delle cellule epatiche che lo costituivano e la loro coltura in vitro. Dopo l'infezione con un vettore retrovirale che veicolasse il gene per un corretto recettore delle LDL, le cellule sono state reimmesse nella paziente mediante un catetere impiantato in una diramazione del sistema venoso portale. Questa paziente ha avu-

to un miglioramento piuttosto rapido che si è mantenuto stabile per un lungo periodo.

3.2.3 La fibrosi Cistica

La fibrosi cistica è una malattia autosomica recessiva determinata da un deficit di trasporto degli ioni cloro attraverso le cellule epiteliali causato da mutazioni nel gene CFTR che codifica appunto per un canale del cloro regolato dal cAMP. L'espressione primaria del difetto è nei polmoni dove si accumula una densa secrezione mucosa che predispone ad infezioni croniche. Poiché non esistono metodi per coltivare le cellule polmonari in laboratorio, sono stati compiuti tentativi di terapia genica in vivo. Dal momento che le cellule epiteliali sono differenziate non si possono utilizzare vettori retrovirali. Nei tentativi di terapia genica sono quindi stati utilizzati vettori adenovirali o liposomi per trasferire un minigene CFTR di dimensioni adeguate sia grazie all'utilizzo di un broncoscopio sia attraverso le cavità nasali. Il primo protocollo basato sull'uso degli adenovirus prese il via nel 1993 diede molte preoccupazioni per la sicurezza del procedimento. Il primo paziente trattato con una dose elevata di adenovirus ricombinanti infatti sviluppò una preoccupante reazione a livello polmonare. Questa esperienza ha fatto comprendere la necessità di stabilire anticipatamente quale fosse la massima dose di adenovirus tollerabile. I tentativi di terapia genica basati sui liposomi sono considerati più sicuri, ma ci si aspetta un'efficienza del trasferimento genico molto inferiore.

3.3 La terapia genica dei tumori

Per la terapia genica contro il cancro sono state utilizzate molte strategie e attualmente vi sono in atto diversi protocolli (circa il 70% di quelli avviati) di terapia. Ciò dipende in gran parte dalla gravità delle malattie che si vorrebbero trattare e dai notevoli finanziamenti elargiti alla ricerca contro i tumori, ma anche dalla relativa facilità nell'applicare trattamenti che si basano sull'uccisione mirata di cellule patologiche sia mediante l'uso di metodi artificiali

sia mediante il potenziamento della risposta immunitaria. Contro il cancro si possono ipotizzare sia strategie per la riduzione del tumore sia strategie che puntano invece alla sua completa eradicazione. Le strategie per la riduzione del tumore considerano che non ci si aspetta che molti degli attuali protocolli di terapia genica contro il cancro abbiano un successo del 100% nel colpire le cellule tumorali, ma che comunque questi sistemi riescano a ridurre drasticamente la massa tumorale in modo per lo meno analogo ai trattamenti radioterapici e chemioterapici che però presentano notevoli effetti tossici collaterali. Al contrario le strategie per l'eliminazione del tumore mirano all'uccisione del 100% delle cellule cancerogene di un individuo. Purtroppo però, indipendentemente dal metodo utilizzato, la completa eliminazione delle cellule tumorali può essere difficilmente ottenibile a causa della loro rapida evoluzione e della forte selezione che hanno verso cellule tumorali resistenti allo schema scelto per la loro eradicazione. Al momento in questo campo vi sono tre principali strategie attuabili: trasferimento genico nei linfociti che infiltrano il tumore, immunoterapia adottiva mediante modificazione genetica delle cellule tumorali e immunoterapia adottiva mediante modificazione genetica dei fibroblasti.

3.3.1 Il trasferimento genico nei linfociti che infiltrano il tumore

Uno dei primi protocolli di terapia genica utilizzava proprio le cellule del sistema immunitario per indirizzare in modo specifico una proteina contro un tumore. Il gene veicolato codificava per una citochina detta TNF α che veniva indotto nei linfociti infiltranti il tumore (TIL) nel tentativo di aumentarne l'efficacia antitumorale. La popolazione dei TIL è una normale popolazione di linfociti T che però è capace di trovare gli infiltrati tumorali e di infiltrarvi, se i TIL fossero in numero sufficiente potrebbero da soli distruggere il tumore. Già il TNF α da solo ha un effetto tossico verso il tumore, tuttavia il TNF α è molto tossico anche per le altre popolazioni cellulari e la sua iniezione endovena ha notevoli effetti collaterali negativi che hanno appunto fatto pensare alla possibilità di utilizzarlo

solo sul tumore mediante l'uso dei TIL come cellule bersaglio. Purtroppo questo tipo di terapia genica è stato caratterizzato da un'efficienza piuttosto bassa ed inoltre i TIL sembrano regolare negativamente o comunque ridurre l'espressione del TNF?

3.3.2 L'immunoterapia adottiva mediante modificazione genetica delle cellule tumorali

Risultati incoraggianti sono stati ottenuti da studi su animali nei quali le cellule tumorali venivano modificate ex-vivo mediante l'inserzione di geni codificanti varie citochine e poi reimpiantate nell'animale stesso. Per tutte le citochine utilizzate le cellule tumorali modificate smettevano di crescere e poi regredivano. Quando però si sono trattati animali con tumori piuttosto grandi, i risultati si sono rivelati molto meno soddisfacenti. Ciò nonostante, l'idea di utilizzare le cellule del tumore modificate per farne una specie di vaccino contro il tumore stesso nel paziente ha avuto molta presa e sono state approvate varie sperimentazioni di terapia genica sull'uomo che mirano ad inserire geni di citochine mediante vettori retrovirali nel tentativo di riuscire a trattare un'ampia gamma di tumori.

3.3.3 L'immunoterapia adottiva mediante modificazione genetica dei fibroblasti

Un problema che si incontra con la terapia dei tumori ex-vivo è la difficoltà di far crescere in vitro le cellule tumorali infatti, meno del 50% delle linee cellulari tumorali è in grado di crescere in colture a lungo termine. Come alternativa, in alcuni casi, sono stati modificati i fibroblasti che si adattano molto più facilmente alle condizioni della coltura. Ad esempio il trasferimento di geni per citochine come l'IL4 o l'IL5 in fibroblasti della pelle cresciuti in coltura è alla base di alcuni tentativi terapeutici per trattare il carcinoma della mammella, quello del colon-retto, il melanoma ed il carcinoma renale. In questi casi i fibroblasti modifi-

cati con i geni delle citochine vengono mescolati a cellule tumorali irradiate e poi iniettati sottocute. L'idea è che la secrezione localizzata di citochina da parte dei fibroblasti modificati induca una forte risposta immunitaria contro le circostanti cellule tumorali irradiate cui seguirà una risposta sistemica contro il tumore.

4 I vettori: caratteristiche e limiti

L'efficienza di trasduzione di un gene esogeno in una cellula bersaglio dipende fortemente dal vettore scelto per veicolare il DNA all'interno della cellula. Lo studio e la ricerca di vettori utilizzabili in terapia genica con caratteristiche adatte al tipo di patologia su cui si vuole intervenire, alla lunghezza del gene che si vuole inserire, al tipo di tessuto bersaglio della terapia, alla quantità ed alla durata dell'espressione del prodotto genico rimane quindi di primaria importanza. I vettori possono essere virali o non virali, anche se per ora sono più usati vettori virali perché i virus sono trasportatori naturali di acidi nucleici all'interno della cellula e quindi una volta resi inoffensivi per l'uomo si presentano come ideali macchine per il trasporto di geni esogeni. I vettori virali si dividono in vettori retrovirali, vettori adenovirali, vettori derivati dall'herpes simplex virus e vettori adenoassociati. I virus ricombinanti utilizzati per la terapia genica ex-vivo sono progettati per essere inattivi: solitamente sono stati privati dei geni virali necessari per la replicazione, al posto dei quali sono stati inseriti i geni di interesse terapeutico che si vuole dare al paziente. Questi virus incompetenti per la replicazione vengono detti difettivi mentre sono utilizzabili per l'infezione delle singole cellule non sono più in grado di dar luogo ad un'infezione produttiva. Tuttavia, esiste la remota possibilità che i virus introdotti possano ricombinare con altri virus endogeni e quindi originare una progenie virale capace di provocare un'infezione produttiva. Proprio le preoccupazioni riguardanti la sicurezza nell'uso dei virus ricombinanti hanno accresciuto l'interesse per sistemi vettoriali non virali da utilizzare nella terapia genica. Se per la terapia

genica ex-vivo per veicolare il DNA si possono utilizzare le classiche tecniche molecolari come ad esempio la trasfezione con calcio-fosfato o l'elettroporazione, per veicolare i geni anche in-vivo occorre utilizzare metodi più recenti come la microiniezione (che consente di lavorare al massimo su 1000 cellule una per volta vista la lunghezza del procedimento), i liposomi, i complessi molecolari DNA-proteine (che permettono una grande selettività cellulare se si complessa il DNA a proteine caratteristiche di un tipo cellulare) ed il gene-gun (tecnica che non è mai stata molto usata).

NB: Si potrebbe riportare lo schema dei virus anche in ognuna delle pagine specifiche per un solo virus in modo da avere sempre sott'occhio il paragone tra questi diversi tipi di vettore.

4.1 I vettori retrovirali

I vettori retrovirali sono virus a RNA che possiedono una funzione di trascrittasi inversa, capace di sintetizzare una forma di DNA complementare che può integrarsi nel DNA cromosomico. Questi organismi sono estremamente efficienti nel trasferire il DNA alle cellule e l'integrazione del DNA virale, solitamente, avviene in un'unica localizzazione cromosomica. Il DNA integrato può essere propagato in modo stabile alle cellule figlie offrendo così la possibilità di una terapia genica a lungo termine. La semplice iniezione dei vettori retrovirali non è però sufficiente per una terapia genica in vivo, perché essi vengono uccisi dal sistema immunitario umano mediante l'attivazione del complemento. Inoltre, i retrovirus possono essere prodotti solo in quantità relativamente bassa ed infettano soltanto le cellule in attiva divisione, cosa che esclude il loro utilizzo nella cura delle patologie che interessano i tessuti non in divisione come quelle del sistema nervoso. Questa stessa caratteristica dei retrovirus si rivela però molto vantaggiosa per la cura di tumori in tessuti che normalmente non sono proliferanti come ad esempio i tumori del cervello, infatti le cellule cancerogene sono in attiva duplicazione e quindi possono essere infettate in modo selettivo rispetto

al tessuto che le circonda. I vettori retrovirali possono veicolare inserti di DNA lunghi sino a 8kb.

4.2 I vettori basati sul virus Herpes simplex (HSV)

Questi vettori hanno un tropismo specifico per il sistema nervoso centrale (SNC) e possono instaurare nei neuroni infezioni latenti che durano anche tutta la vita. Non sono però in grado di integrarsi e quindi non è possibile avere un'espressione a lungo termine dei geni inseriti. Il loro ruolo principale nella terapia genica sarebbe quello di veicolare i geni ai neuroni per la terapia di patologie neurologiche quali il morbo di Parkinson, di Alzheimer e di Huntington. Come vettori possono ospitare inserti piuttosto grandi anche di 20kb.

4.3 I vettori adenovirali

I vettori adenovirali sono virus a DNA capaci di produrre infezioni delle prime vie respiratorie e dotati di un tropismo particolare per l'epitelio respiratorio, la cornea ed il tratto gastrointestinale. Questi virus possono infettare un'ampissima gamma di tipi cellulari. L'ingresso nelle cellule avviene mediante endocitosi mediata da recettori ed è molto efficiente, ma il DNA inserito non sembra integrarsi e quindi l'espressione dei geni inseriti può essere mantenuta solo per brevi periodi. I vettori adenovirali possono essere prodotti con titoli elevatissimi e solitamente accettano inserti grandi sino a 7-8kb. Poiché possono praticamente infettare ogni tipo di cellula umana può risultare difficile la loro utilizzazione in terapie geniche contro il cancro, dove si vuole uccidere solo le cellule tumorali senza causare tossicità alla cellule sane circostanti, ma hanno trovato estese applicazioni nella terapia genica della cura delle patologie genetiche ereditarie. Un problema legato al loro utilizzo è che nel corpo umano tendono ad indurre forti risposte immunitarie.

4.4 I vettori basati su virus adeno-associati (AAV)

Questi vettori sono un piccolo gruppo di virus a DNA a singolo filamento che solitamente non è in grado di effettuare un'infezione produttiva senza la collaborazione di un virus helper coinfezzante, come ad esempio un adenovirus o un HSV. Senza la coinfezione un AAV si integra nel DNA cromosomico in un sito specifico, ma solo la successiva coinfezione attiva il DNA del virus integrato. Questi vettori possono ospitare piccoli inserti di 4.5kb al massimo, ma hanno il vantaggio di fornire di fornire un'espressione genica a lungo termine e con un elevato grado di sicurezza, infatti essi si integrano nel cromosoma ma, poiché per inserire il gene esogeno occorre eliminare il 96% del loro genoma originario, non possiedono praticamente più elementi virali.

4.5 Iniezione diretta o bombardamento con particelle (microiniezione-gene gun)

In alcuni casi il DNA può venire iniettato direttamente in un singolo tessuto come ad esempio nel muscolo senza l'utilizzo di nessun vettore (DNA nudo) per mezzo di una semplice siringa. Quest'approccio è stato utilizzato per la distrofia muscolare di Deuchenne. Altrimenti si può bombardare il tessuto con micropallini metallici, in genere di oro colloidale, rivestiti di DNA e sparati (gene gun) dentro le cellule con una specie di pistola. Con questo metodo si è riusciti ad ottenere il trasferimento genico in numerosi tessuti differenti. Tali tecniche sono molto semplici e relativamente sicure. Tuttavia il trasferimento genico è poco efficiente e si raggiunge solo un basso livello di integrazione stabile del DNA iniettato. Quest'ultimo aspetto è particolarmente svantaggioso nel caso di cellule proliferanti ed implica la necessità di ripetere le iniezioni nel tempo.

4.6 Endocitosi mediata da recettori (complessi molecolari DNA-proteine)

In questo caso il DNA viene associato a una molecola in grado di legare uno specifico recettore sulla superficie cellulare, inducendo così l'endocitosi e quindi il trasferimento del DNA all'interno delle cellule. L'associazione normalmente si ottiene legando covalentemente una polilisina alla molecola che lega il recettore sulla membrana cellulare (detta ligando) e poi legando in modo reversibile il DNA del gene esogeno da introdurre alla polilisina stessa, infatti questo è carico negativamente mentre la polilisina è carica positivamente. Ad esempio gli epatociti sono caratterizzati dalla presenza di recettori di membrana per l'asialoglicoproteina che estraggono direttamente dal siero. Complessando la polilisina all'asialoglicoproteina ed il DNA alla polilisina, si può veicolare quest'ultimo nelle cellule del fegato solo mediante iniezione endovena. L'efficienza del trasferimento genico può essere elevata tuttavia il metodo non è studiato per permettere l'integrazione dei geni trasferiti nel cromosoma dell'ospite. Un altro problema è che i complessi DNA-polilisina nel torrente circolatorio non sono molto stabili per cui parte del DNA viene perso nel circolo mentre la polilisina resta stabilmente legata all'asialoglicoproteina e quindi raggiunge il fegato.

4.7 I liposomi

I liposomi sono vescicole sferiche composte da un doppio strato di lipidi sintetici che assomiglia alla struttura delle membrane biologiche. Il DNA da trasferire viene impacchettato artificialmente dentro i liposomi che vengono usati direttamente per trasferire il DNA in un adeguato tessuto bersaglio. Il rivestimento lipidico permette al DNA di sopravvivere anche in-vivo e di attaccarsi alle cellule in cui viene introdotto per endocitosi di membrana. L'efficienza del trasferimento genico è bassa ed il DNA introdotto non è progettato per integrarsi nel DNA cromosomico per cui l'espressione dei geni inseriti risultante è soltanto transitoria.

5 I problemi tecnici della terapia genica

Idealmente il trasferimento di geni esogeni dev'essere sicuro per il paziente e per gli operatori, efficiente sia in termini quantitativi sia qualitativi e selettivo per un determinato bersaglio cellulare. La sicurezza si basa sulla necessità di non causare danni diretti al paziente e soprattutto di non modificare stabilmente il patrimonio genetico umano. A questo proposito per ora la maggior parte degli sforzi della terapia genica sono diretti verso quelle patologie che non lasciano prevedere la possibilità che il paziente abbia dei figli (ad esempio su malati terminali di neoplasie), ma in futuro la necessità di non modificare stabilmente la linea germinale potrebbe divenire un problema reale e concreto. Comunque la terapia genica attuale è esclusivamente somatica sia a causa delle perplessità etiche che solleverebbe la manipolazione di cellule germinali sia a causa dei limiti tecnologici esistenti. L'efficienza della terapia invece dipende dal numero di geni che si riesce a veicolare in un paziente e dalla facilità con cui questi possono venir inseriti stabilmente nelle cellule. Ogni sistema cellulare presenta sotto quest'aspetto caratteristiche differenti, ma è per ora ancora l'efficienza che si riesce ad ottenere variando la scelta delle strategie note è ancora troppo bassa rispetto alle ambizioni terapeutiche. Un altro problema è quello della selettività del bersaglio cellulare da trasfettare, questa è maggiore se si procede ex-vivo, mentre è più difficile da garantire in-vivo, soprattutto se si utilizzano vettori virali che almeno in teoria non hanno limiti d'infezione. Al momento sono in studio differenti strategie per permettere l'ingresso del vettore solo in cellule specifiche anche in-vivo, ma nonostante il grande impegno i risultati sono stati per ora modesti. Un altro aspetto non trascurabile è legato all'immunogenicità che alcuni vettori o che l'inserimento di determinati segmenti genici in determinate cellule può creare. L'immunogenicità infatti può causare fenomeni acuti come ad esempio le reazioni simil-influenzali o renitiche conseguenti all'uso di vettori adenovirali o fenomeni subacuti e cronici in particolare causati dagli

anticorpi prodotti dall'organismo ospite che riescono a riconoscere le cellule bersaglio trasfettate e quindi a distruggerle annullando tutti gli effetti della terapia genica.

6 Trial clinici in atto

Al mondo i trial clinici in atto sono al momento circa 400 di cui circa il 70% si svolge negli USA, il 20% in Europa ed il resto diviso nell'ordine tra Australia, Asia e Africa. Quasi nessuno di questi trial è alla fine. In Europa, la maggior parte dei protocolli viene attuata in Svizzera, cui seguono nell'ordine Francia, Italia, Germania e Olanda.

Link a terapia genica

7 L'etica della terapia genica nell'uomo

Tutti i tentativi di terapia genica prevedono solo il trattamento di tessuti somatici (terapia genica delle cellule somatiche). La terapia genica delle cellule somatiche non ha fatto sorgere problemi etici se non per la sua possibile applicazione nella cosiddetta ingegneria generica migliorativa che consiste in qualsiasi trattamento che preveda la modificazione genetica delle cellule di un individuo per migliorarne alcuni tratti come ad esempio l'altezza senza curarne una malattia. E' ovvio che occorre compiere ogni sforzo per garantire la sicurezza dei pazienti, soprattutto perché le tecnologie usate al momento per la terapia genica sono molto lontane dall'essere perfette. D'altra parte, restringendo il trattamento alle cellule somatiche le conseguenze di un trattamento sono limitate ad un singolo paziente che ha volontariamente acconsentito a sottoporsi al trattamento stesso. Molti, quindi considerano la terapia delle cellule somatiche accettabile dal punto di vista etico almeno quanto i trapianti d'organo e pensano che dopo attenta valutazione sia eticamente corretto dare approvazione a determinati progetti. Non si può inoltre dimenticare che i pazienti scelti per essere sottoposti a questi trattamenti soffrono di malattie gravemente debilitanti e spesso mortali per le quali

le terapie convenzionali sono inefficaci. Quindi, nonostante le ovvie imperfezioni della tecnologia, può ancora essere considerato non etico il negare questo trattamento che in effetti rappresenta l'unica possibilità terapeutica. Per quanto riguarda la terapia genica delle cellule germinali invece la questione è completamente differente. E' stata praticata con successo negli animali, ad esempio per correggere la β -talassemia, ma finora non è mai stata autorizzata per trattare patologie umane ed è probabile che non lo sia neppure in un prossimo futuro sempre che prima o poi venga approvata. La terapia genica della linea germinale nell'uomo non viene praticata sia a causa di perplessità di ordine etico sia dei limiti tecnologici della manipolazione delle cellule della linea germinale. Infatti questa tecnologia richiederebbe la modificazione del materiale genetico che costituisce i cromosomi, ad esempio mediante l'integrazione cromosomica del gene introdotto. I sistemi vettoriali che consentono di raggiungere questo risultato però non permettono il controllo accurato del punto o dell'evento d'integrazione ed inoltre nella terapia genica somatica l'unica seria preoccupazione riguardo alla mancanza di controllo sul destino dei geni trasferiti è la prospettiva che una o più cellule vadano incontro a trasformazione neoplastica. Invece, sulla linea germinale, la modificazione genetica ha implicazioni che non si limitano al destino di un'unica o di poche cellule. Infatti oltre al cancro, l'inserimento accidentale di un retrovirus ricombinante dentro un gene importante potrebbe determinare ad esempio una nuova mutazione patogena ereditaria. Vi sono poi svariati problemi etici connessi alla modificazione della linea germinale. La modificazione genetica delle cellule della linea germinale nell'uomo può avere infatti conseguenze non solo per l'individuo le cui cellule siano state originariamente alterate, ma anche e soprattutto per tutti gli individui che ereditano questa modificazione genetica nelle generazioni successive. La terapia genica delle cellule della linea germinale inevitabilmente comporterebbe il non tenere conto del diritto di questi individui di poter scegliere innanzi tutto se la loro costituzione genica debba essere modificata. Taluni, comunque, pensano che in futuro la tecnologia

per modificare le cellule migliorerà fino a raggiungere un livello accettabile e, posto che ci siano regole e tutele sufficienti, non dovrebbero più esserci obiezioni di carattere etico. Altri, fanno notare che, oltre al problema dei diritti degli individui futuri, questa tecnologia condurrà inevitabilmente a migliorare i caratteri genetici. Ciò comporterà un programma di eugenetica o genetica positiva che consiste nella selezione artificiale dei geni considerati in grado di conferire caratteri vantaggiosi. Anche se ciò fosse accettabile resta il problema di chi sia in grado di decidere quali caratteri siano davvero da considerarsi vantaggiosi al di là di quelli strettamente legati a una o più patologie. I ripugnanti programmi tra cui ad esempio quelli della Germania nazista e di molti stati degli USA in cui si praticava la sterilizzazione artificiale degli individui giudicati mentalmente ritardati dovrebbero farci ricordare i molti potenziali pericoli connessi alla modificazione della linea germinale dell'uomo. D'altronde la necessità di una terapia genica della linea germinale è del tutto discutibile. Infatti se la modificazione genetica della linea germinale può essere considerata un modo di evitare quello che altrimenti sarebbe l'eredità certa di una nota mutazione pericolosa occorre domandarsi quanto spesso insorga questa situazione e quanto possa poi essere facile intervenire. Una probabilità del 100% di ereditare una mutazione nociva potrebbe verificarsi soprattutto in due modi. Uno è quando una donna affetta sia omoplasmica per una mutazione dannosa nel genoma mitocondriale e desidera comunque avere un figlio. In questo caso il problema è legato al fatto che, a causa della molteplicità delle molecole di DNA mitocondriale coinvolte, per questo tipo di malattie si ha ancora pochissimo da offrire come terapia genica. Una seconda situazione riguarda l'eredità di mutazioni del genoma nucleare. Per aver il 100% di rischio di ereditare una mutazione dannosa sarebbe necessaria l'unione tra due individui entrambi malati della stessa malattia a eredità recessiva, evento di per sé estremamente raro. Invece, la maggior parte delle mutazioni nel genoma nucleare viene ereditata con al massimo un rischio del 50% (per malattie a eredità dominante) o del 25% (per malattie ad eredità reces-

siva). Quindi la fecondazione in vitro fornisce in questo caso un modo molto più accessibile, semplice e sicuro per modificare la linea germinale. Infatti poiché la fecondazione in vitro comporta la produzione di diversi ovuli fecondati, risulta molto più semplice cercare tra questi gli ovuli normali e usarli per l'impianto piuttosto che modificare geneticamente ovuli fecondati identificati come portatori della mutazione dannosa.

tive misure di contenimento, prende in considerazione tutti gli elementi di rischio che entrano a far parte della sperimentazione clinica e, più precisamente, dei costrutti, dei vettori virali e delle cellule somatiche geneticamente modificate, utilizzati per la terapia genica; dell'accertamento dei potenziali eventi di ricombinazione genetica in vivo; dell'analisi degli animali da laboratorio per gli studi preclinici e dei vettori retrovirali o adenovirali usati in terapia genica.

8 Linee guida per la sicurezza della sperimentazione in terapia genica

Nel supplemento del bimestrale di biotecnologia BioTec (Anno 1, n. 5, settembre-ottobre 1996) sono state riportate queste linee guida stilate da un gruppo di lavoro costituito nell'ambito delle funzioni del "Comitato scientifico per i rischi derivanti dall'impiego di agenti biologici ed il coordinamento delle attività biotecnologiche" della presidenza del consiglio dei ministri. Il gruppo di lavoro era presieduto dal Prof. Leonardo Santi, presidente del Comitato scientifico, ed era coordinato dal Prof. Alberto Mantovani. Nella premessa alle linee guida si puntualizza che: . Le linee guida stilate per la terapia genica fanno sostanzialmente riferimento, per gli aspetti della sicurezza, alle Direttive 90/219 e 90/220 CEE sull'uso dei microrganismi geneticamente modificati, nonché al decreto legislativo 626/1994 sulla protezione dei lavoratori esposti ad agenti biologici ed al decreto legislativo 116/92 sull'utilizzo di animali transgenici in terapia genica. Più in particolare, vengono ricordate le norme atte a garantire il contenimento dei microrganismi geneticamente modificati nei laboratori dove si realizzano gli esperimenti preliminari per la terapia genica Il tipo di contenimento necessario è indicato con le sigle P1, P2, P3 e P4 che corrispondono a quattro diversi livelli di rischio: trascurabile, basso, moderato ed elevato, secondo la nomenclatura introdotta a livello internazionale dalle linee guida dei National Institutes of Health (NIH) degli Stati Uniti. La valutazione dei rischi e, quindi, le rela-