

Negli ultimi 10 anni l'attività scientifica del mio gruppo, composto da diversi collaboratori con contratti di lavoro finanziati anche dall'associazione Piera Cutino, si è focalizzata nella realizzazione della terapia genica per la cura della talassemia e dell'anemia falciforme.

La terapia genica ha lo scopo di eliminare il fabbisogno trasfusionale attraverso la sintesi di catene β -globiniche, prodotte dall'espressione di un gene globinico introdotto all'interno delle cellule staminali del midollo osseo del paziente. Negli anni ancora precedenti, ricerche condotte dal mio gruppo avevano contribuito alla conoscenza dei meccanismi molecolari che determinano l'espressione dei geni, e questo, assieme all'acquisizione di tecniche di trasferimento genico, ci permettono di applicare diversi protocolli di terapia genica in studi preclinici.

Le β -talassemie e l'anemia falciforme sono, per diverse ragioni, malattie candidate per la cura genetica. Si conoscono le basi molecolari che determinano la malattia, inoltre il gene globinico, anche se complesso nella sua regolazione, è di piccole dimensioni e si presta ad essere inglobato in vettori ricombinanti per il trasferimento genetico. La terza ragione è che non esistono terapie che sono definitivamente curative da offrire ai pazienti affetti, se non il trapianto di midollo osseo da donatore. Anche se quest'ultimo trattamento può avere successo, c'è, oltre alla difficoltà di trovare un donatore compatibile, il rischio di serie complicanze immunologiche post-trapianto. In generale, il protocollo prevede la purificazione delle cellule staminali (CD34+) dal midollo osseo del paziente, la correzione genetica *ex-vivo* mediata da vettori virali ricombinanti per il gene della β -globina umana e difettivi per la replicazione, ed il reimpianto delle cellule geneticamente modificate nel midollo osseo del paziente.

Nei primi anni di svolgimento di questa ricerca abbiamo usato vettori oncoretrovirali ricombinanti per il gene della β -globina umana. I vettori contenevano le sequenze virali minime per garantire l'impacchettamento, la retrotrascrizione e l'integrazione nel genoma dell'ospite; il trasgene consisteva della sequenza codificante il gene β -globinico umano (esoni ed introni) e delle sequenze regolatrici fiancheggianti il gene (promotore e sito di poliadenilazione).

I nostri primi esperimenti di trasferimento genico nelle cellule eritroidi di topo in coltura non hanno ottenuto risultati soddisfacenti a causa dell'instabilità genetica di questi vettori. Dal 2003 abbiamo usato vettori ricombinanti basati su lentivirus, che oltre ad essere più stabili, assicurano anche livelli di produzione della globina più alti.

In collaborazione con il gruppo del prof. Michel Sadelain del Memorial Sloan-Kettering Cancer Centre (MSKCC) di New York, che per primo ha dimostrato nel 2000 la possibilità di correggere la malattia nel topo talassemico mediante questi vettori virali, abbiamo condotto studi di terapia genica in vitro usando le cellule staminali ematopoietiche dei pazienti talassemici e falcemici Siciliani.

Sulla base di questi risultati, alcuni dei quali pubblicati nella prestigiosa rivista scientifica *Nature Biotechnology* (**Nature Biotechnology 2006, vol 24 pag 89-94**) è stato preparato un protocollo clinico per la sperimentazione nell'uomo. Il protocollo ha già ricevuto l'approvazione della RAC (comitato di valutazione delle terapie con DNA ricombinante) per un trial clinico negli Stati Uniti ed è in via d'approvazione da parte della FDA (food and drugs administration). I primi trials clinici saranno un banco di prova per testare la fattibilità e la sicurezza della metodica e sicuramente porteranno ad un secondo step che consisterà nel perfezionamento della metodologia.

Nonostante i risultati ottenuti rappresentano importanti passi avanti verso la realizzazione dei primi trials clinici di terapia genica per la β -talassemia, essi rendono evidenti anche gli ostacoli che devono essere ancora superati: i vettori a disposizione richiedono ancora di essere perfezionati con modificazioni che dovrebbero garantire una maggiore efficienza e una maggiore sicurezza.

Infatti, la correzione genetica delle emoglobinopatie nei modelli animali, è stata ottenuta solo quando diverse copie di trasgene (3-4 copie) sono trasferite per cellula. In contrasto, usando gli stessi modelli animali per la β -talassemia e per l'anemia falciforme in studi di trapianto eterologo di

midollo osseo, si è dimostrato che livelli di chimerismo da 30 a 50% tra cellule normali di donatore e cellule talassemiche di ricevente determina la completa correzione dei parametri ematologici e patologici.

Sebbene le ragioni di questa differenza tra la terapia genetica e gli studi di chimerismo possono essere diverse, è verosimile che il fattore principale che determina questi risultati contrastanti sia il fenomeno del silenziamento dei vettori.

La maggior parte del genoma cellulare, infatti, è in una configurazione cromatinica non attiva, pertanto ogni volta che il vettore s'inserisce in zone non permissive per la trascrizione, esso viene silenziato determinando l'inefficacia del trattamento di correzione genetica.

Una soluzione al problema del silenziamento potrebbe essere data dall'inclusione nel vettore di sequenze d'isolatori genomici, elementi genetici che in natura fiancheggiano unità trascrizionali e determinano domini funzionali indipendenti.

Per tale motivo in questi ultimi anni ci siamo dedicati, in collaborazione con il gruppo del prof. G. Spinelli, dell'Università degli Studi di Palermo, allo studio di un isolatore genomico di riccio di mare allo scopo di inserirlo nei vettori virali ed imperire il loro silenziamento dopo integrazione nel genoma della cellula ospite.

Le nostre ricerche pubblicate nel 2005 hanno dimostrato che l'isolatore di riccio di mare funziona anche in cellule umane eritroidi (**Blood Cell Molecules and Diseases 2005, vol 35 pag 339-344**). Questi risultati sono importanti per incoraggiare l'uso di quest'isolatore nella costruzione di vettori per la terapia genetica.

La possibilità di schermare un vettore integrato dalla cromatina circostante è importante anche per la sicurezza della terapia genetica. Infatti come non si desidera che la cromatina dell'ospite influenzi l'espressione del trasgene, allo stesso modo, non è auspicabile che le sequenze contenute nel vettore ricombinante interferiscano con il programma di regolazione genica della cellula ospite. Recentemente sono stati riportati casi di leucemia in un trial clinico di terapia genetica mediata da vettori oncoretrovirali, in bambini affetti da una grave forma d'immunodeficienza X-linked (X-SCID1). In questi casi, la leucemia è stata determinata dall'inserzione del vettore ricombinante all'interno dell'oncogene LMO2.

Esperimenti attualmente in corso nel nostro laboratorio sono focalizzati allo studio della funzionalità di questo isolatore nei vettori virali introdotti all'interno delle cellule staminali dei pazienti talassemici e alla sicurezza di questi vettori.

Santina Acuto

Responsabile della linea di ricerca "terapia genica"

Unità di ricerca "Piera Cutino"

Ematologia II con Talassemia

Azienda Ospedaliera "Vincenzo Cervello" - Palermo