



TERAPIA GENETICA: PROBLEMI E APPLICAZIONI

Negli ultimi decenni la conoscenza dei codici genetici, del meccanismo di azione e del legame tra mutazione genetica e malattia è notevolmente migliorata. Grazie a questo è stata sviluppata l'idea di usare la terapia genica come efficace strumento per combattere tutti i tipi di malattie collegabili ad alterazioni genetiche.

Semplificando in modo estremo, un gene è un segmento di DNA che attraverso due fasi successive, trascrizione e traduzione, converte un codice di acidi nucleici in un codice di aminoacidi che dà origine ad una specifica proteina. Quindi le proteine sono il prodotto finale dei geni. Le cellule hanno bisogno fino a 10.000 geni per le funzioni di base, altre decine di migliaia di geni sono espressi unicamente in tessuti specifici conferendo loro proprietà peculiari. Tutti i processi vitali dipendono pertanto da una corretta espressione dei geni e di conseguenza tutti i processi patologici sono caratterizzati da un'alterazione di questo equilibrio.

Perciò la diretta interferenza nell'espressione del gene può condurre alla correzione di un largo numero di patologie. Ma se si ipotizza di poter correggere un difetto mediante "somministrazione" diretta di materiale genetico alle cellule somatiche ci si

troverà ad affrontare un problema quasi insormontabile. L'organismo è composto da miliardi di cellule. Trasferire l'informazione genetica significa "infettarne" un numero notevole con il materiale genetico considerando anche che non esiste un sistema specifico per il trasporto del materiale genetico attraverso la membrana cellulare.

Oltre alla possibilità di intervenire direttamente sui processi patologici, l'utilizzo della terapia genetica è legata anche ad un altro fenomeno: l'invecchiamento.

L'aspettativa di vita si è incrementata notevolmente dall'inizio del secolo e con essa sono diventate importanti malattie, come il cancro e l'Alzheimer, ma anche l'artrite reumatoide, l'osteoporosi, che sono direttamente correlate all'invecchiamento. Tali malattie quando non mettono direttamente a rischio la vita del paziente ne diminuiscono significativamente la qualità della vita.

Il mantenimento della qualità della vita e non una passiva accettazione dell'invecchiamento è diventata determinante nel terzo millennio, almeno nei paesi avanzati. La terapia genica si ipotizza potrebbe intervenire come mezzo per ritardare gli effetti naturali dell'invecchiamento soprattutto nelle sue forme più sofisticate, come quella dell'ingegneria tissutale, che utilizza il materiale genetico per favorire lo sviluppo naturale o la sostituzione di tessuti danneggiati irreversibilmente da una malattia.

Le ere genetiche

L'approfondimento della conoscenza dei geni e della loro regolazione ha portato ad uno sviluppo continuo delle possibilità applicative dei medesimi.

La prima fase è stata essenzialmente diagnostica: l'analisi delle sequenze dei geni ha permesso di mettere in relazione specifiche malattie con l'alterazione di uno specifico gene ed in alcuni casi indicare l'esatta posizione del nucleotide "sbagliato" che dava luogo all'erronea o mancata espressione di una specifica proteina e la conseguente cascata di eventi che portava alla malattia.

La seconda fase ha visto l'utilizzo sempre più ampio di geni

specifici, isolati ed introdotti in microorganismi idonei, come modello per la sintesi di proteine terapeuticamente utili (interferoni, insuline, eritropoietina...). Questo utilizzo è ormai assodato e l'utilizzo di proteine terapeutiche di derivazione estrattiva va man mano scemando.

La terza fase è l'uso del gene come farmaco vero e proprio in maniera diretta. Il materiale genetico viene direttamente trasferito nella cellula malata per ovviare ad un malfunzionamento del corredo genetico originale.

Questa modalità di utilizzo dell'informazione genetica, benché promettente, è ancora lontana da una concreta applicazione a causa delle difficoltà oggettive che andremo di seguito ad illustrare.

L'ultima fase, ancora agli inizi, sarà quella della comprensione del funzionamento del codice genetico di cui abbiamo recentemente completato la sequenza.

Non si tratta semplicemente di capire quale proteina viene codificata da un singolo gene ma le interrelazioni tra diverse migliaia di geni il cui coordinamento porta allo svolgimento corretto o meno di una determinata funzione.

La conoscenza approfondita di ciò è l'indispensabile presuppo-

In memoria di Carlo Carlini

Il 9 giugno scorso è venuto a mancare il prof. Carlo Carlini, piegato da una terribile malattia contro la quale aveva lottato con grande coraggio. Si era laureato con lode in Chimica Industriale all'Università di Pisa nel 1965, discutendo una tesi di laurea sperimentale sulla polimerizzazione stereospecifica. Suo relatore era stato il prof. Piero Pino, primo allievo del prof. Giulio Natta Premio Nobel 1963 per la Chimica.

Carlini, il cui lavoro di ricerca iniziò appunto poco dopo il conferimento del Nobel a Natta, fece parte, come uno dei giovani componenti di maggior spicco, del gruppo di ricerca che sotto la guida del prof. Pino portò alla elegante dimostrazione della origine del controllo stereochimico nella polimerizzazione delle olefine attraverso la identificazione della struttura chirale dei siti catalitici. Dopo aver sviluppato la sua carriera a Pisa fino a professore associato, a metà degli anni Ottanta, come vincitore di un concorso nazionale di prima fascia, venne chiamato a insegnare Chimica Industriale all'Università di Bologna. Qui creò, con un lavoro più che decennale, un gruppo di ricerca in Chimica Macromolecolare, che ha ottenuto risultati di grande rilievo internazionale nel settore dei polimeri fotocromici. Da circa dieci anni Carlini era di nuovo all'Università di Pisa dove era stato richiamato per trasferimento con consenso unanime, fornendo fondamentali contributi allo sviluppo delle ricerche nel settore della catalisi industriale e della polimerizzazione. Si era inoltre dedicato con grande entusiasmo ed impegno alla didattica, dando un contributo essenziale come Presidente di due corsi di laurea, nelle complesse e delicate fasi della Riforma.

Autore di circa 200 pubblicazioni a livello internazionale e di numerosi brevetti, conferenziere in molti congressi in Italia e all'estero, il Prof. Carlini è stato indubbiamente una delle figure di spicco della Chimica industriale nazionale e internazionale. La dedizione al lavoro, la sua correttezza e disponibilità, l'inesauribile entusiasmo per la ricerca, che lo ha accompagnato fino agli ultimi momenti, lo hanno fatto apprezzare come uomo e come scienziato da tutti quelli che hanno avuto la fortuna di lavorare con lui nel corso di oltre 40 anni di carriera accademica. Nel febbraio di quest'anno, quale ulteriore riconoscimento per i suoi meriti scientifici e per il contributo rilevante alla vita e al funzionamento dell'ateneo, era stato uno degli insigniti dell'Ordine del Cherubino, un'onorificenza accademica che viene conferita dal Rettore dell'Università di Pisa, su delibera del Senato accademico, a quei docenti dell'Ateneo pisano che abbiano contribuito ad accrescerne il prestigio.

Anna Maria Raspolli Galletti

sto per un intervento mirato e specifico sulle funzioni dell'organismo che si vogliono correggere.

Somministrazione terapeutica dei geni: differenza con la somministrazione di molecole convenzionali

La somministrazione di materiale genetico a scopo terapeutico può avvenire in differenti modalità. Possiamo in primo luogo distinguere tra somministrazione sistemica e locale.

La somministrazione sistemica comporta l'introduzione dell'agente terapeutico nel circolo sanguigno.

Ciò viene effettuato quando l'organo od il tessuto target non è raggiungibile direttamente.

I difetti di questa metodica sono la mancanza di specificità in quanto il gene viene distribuito indistintamente in tutto l'organismo e quindi la concentrazione locale viene ad essere molto bassa a meno di una somministrazione di quantità massive. Inoltre alcuni tessuti, come la cartilagine, sono scarsamente irrorati.

La somministrazione locale può essere distinta tra *in vivo*, *in vitro* ed *ex-vivo*.

La somministrazione *in vivo* comporta l'introduzione del materiale terapeutico direttamente nel tessuto ammalato. Un problema in questo caso è il mancato controllo della replicazione del materiale genetico.

Una metodica risultata più efficace è quella *in vitro/ex vivo*: in questo caso il gene viene trasferito in cellule cresciute in cultura, l'incorporazione del materiale genetico nelle cellule può essere monitorato direttamente in cultura per valutarne l'efficacia; quando lo si ritiene opportuno le cellule "guarite" vengono reimpiantate nel paziente permettendo loro di svolgere un'azione terapeutica corretta.

Inoltre se noi pensiamo alla terapia genetica come "somministrazione" di geni alle cellule somatiche con lo scopo di prevenire o curare diversi tipi di malattie ci troveremo ad evidenziare immediatamente delle differenze notevoli rispetto alla manipolazione di molecole tradizionali.

Le molecole convenzionali hanno un peso molecolare limitato (alcune centinaia di dalton), se hanno caratteristiche lipofile entrano liberamente nelle cellule o se sono idrofile sono destinate ad agire nello spazio extracellulare o ad essere trasportate da specifici meccanismi di membrana.

Esse agiscono per un periodo relativamente veloce e l'effetto terapeutico è direttamente proporzionale alla concentrazione plasmatica e può essere quindi monitorato. L'attività terapeutica cessa non appena, per effetto della diluizione con i fluidi plasmatici, la concentrazione del farmaco scen-

de al di sotto di valori terapeuticamente utili.

Al contrario, il peso molecolare del materiale genetico è molto più grande e può superare i 10^6 Dalton. I geni per svolgere la loro azione devono essere introdotti nel nucleo, ma non hanno le caratteristiche lipofile idonee a ciò né meccanismi specifici di trasporto. Anche quando riescono a penetrare nel nucleo devono essere incorporati nei cromosomi della cellula per potere svolgere la loro azione per un tempo indefinito. Sulla base di quanto descritto si può comprendere come la somministrazione orale sia estremamente ardua senza l'individuazione di "drug delivery" sofisticati e anche la via iniettabile, senza sistemi opportuni per il trasferimento del materiale genetico all'interno della cellula, abbia ben poche possibilità di successo.

La somministrazione diretta di DNA si è dimostrata improponibile, a causa della labilità della molecola e dei quantitativi elevatissimi che sarebbero necessari per raggiungere livelli terapeuticamente utili.

La somministrazione di materiale genetico a scopo terapeutico, sia su tessuti isolati da reimpiantare sia *in vivo* su organismi ha dovuto ricorrere all'utilizzo di opportuni vettori ("carrier").

La principale distinzione è tra vettori virali e non virali.

Tecnologie per il trasferimento di materiale genetico

Vettori virali

I primi veicoli utilizzati come "cavallo di troia" per somministrare i geni nell'organismo sono stati i virus.

I virus sono organismi sviluppati nel corso di milioni di anni di processo evolutivo. La loro peculiarità è la capacità di introdursi in cellule estranee con il proprio materiale genetico. Per questo motivo sono da subito sembrati il veicolo ideale, disponibile in natura ad un livello altissimo di sofisticazione, per lo scopo oggetto di questa trattazione. Proprio però questa altissima sofisticazione, non completamente compresa e sotto controllo, è stata la principale causa delle delusioni ed insuccessi della terapia genetica, come vedremo più avanti.

Per utilizzare il virus è necessario "eliminare" il corredo genetico originale ed inserire il gene che esprime l'effetto desiderato. Questa semplificazione è veramente estrema e non comunica la sofisticata ingegneria genetica necessaria per rendere il virus veramente idoneo alla realizzazione dello scopo desiderato.

Mantenendo sempre un elevatissimo livello di semplificazione possiamo ipotizzare il seguente schema: il virus contiene anche una parte di materiale genetico che codifica proteine in grado di permettergli di introdursi nella cellula ospite (gene A) ed un

“gene B” che causa la malattia associata al microorganismo. Il gene C sarà il gene che noi abbiamo scelto per svolgere l’azione terapeutica. L’ingegnerizzazione del virus dovrà comportare la sostituzione di B con C lasciando però intatto il gene A che consente al virus di svolgere la sua azione di vettore.

Retrovirus

Il materiale genetico contenuto nei retrovirus è nella forma di RNA mentre il materiale genetico della cellula bersaglio è DNA. Per infettare un organismo il virus deve realizzare una copia DNA del suo RNA. Questa attività è denominata trascrizione inversa ed è effettuata con l’ausilio di uno specifico enzima che si chiama transcriptasi inversa.

Successivamente a questa fase il DNA virale viene incorporato nel DNA dell’ospite per mezzo di un altro enzima virale denominato integrasi.

Una volta che il DNA si è integrato ed è diventato parte effettiva del DNA dell’ospite tutte le cellule figlie conterranno il nuovo materiale genetico. Un problema della terapia genetica che utilizza i retrovirus come vettore è che il nuovo materiale genetico può essere inserito in qualsiasi parte del DNA dell’ospite, alterando, anche in maniera grave, il funzionamento dei geni originali. Si sta ovviando a questa problematica con l’inserimento di enzimi con la “Zinc Finger Nucleasi” che tagliano il DNA solo in zone specifiche.

Adenovirus

Gli adenovirus contengono il proprio materiale genetico come DNA a doppia elica. Gli adenovirus sono virus implicati nei comuni disturbi respiratori, intestinali ed oculari. Il materiale genetico introdotto dall’adenovirus nella cellula infettata non viene però incorporato nel genoma. Rimane isolato nel nucleo pur permettendo la trascrizione dell’informazione codificata.

La nuova informazione non viene però trasmessa con la divisione cellulare ed è limitata alle cellule effettivamente raggiunte dal virus. Ciò comporta continue somministrazioni di materiale genetico ma evita effetti imprevisti dovuti all’integrazione anomala del materiale genetico nel DNA ospite (Fig. 1, da Wikipedia, “Gene therapy”).

Virus Adeno Associati

Appartengono alla famiglia dei Parvovirus e contengono una singola elica di DNA nel loro genoma.

Questi virus possono inserire materiale genetico su un sito specifico del cromosoma 19.

Le principali problematiche di questo vettore virale sono le diffi-

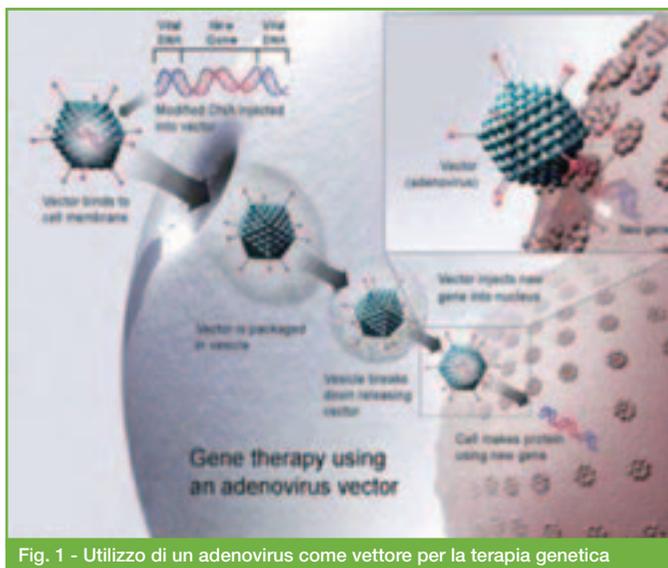


Fig. 1 - Utilizzo di un adenovirus come vettore per la terapia genetica

coltà produttive e la bassa capacità di contenuto in DNA.

Hanno il vantaggio di non essere patogeni e di dare luogo ad una minore risposta immunitaria rispetto agli altri virus. Numerosi studi sono in corso di attivazione con questo tipo di virus, in particolare si sta valutando anche la possibilità di veicolare nel cervello per la loro peculiare capacità di infettare anche cellule quiescenti come i neuroni.

I vettori virali descritti non si indirizzano indifferentemente a tutte le cellule ma ognuno di loro ha delle popolazioni cellulari verso cui possiede affinità maggiore. L’azione di interazione ed infezione di un virus con una cellula è mediata dall’azione delle proteine presenti sulla superficie del virus.

I retrovirus ed i virus adeno-associati hanno una singola proteina di superficie mentre gli adenovirus hanno la proteina di superficie e delle fibre che si estendono oltre la superficie del virus. Queste proteine virali interagiscono con molecole di superficie presenti sull’ospite, come l’eparina solfato o con specifici recettori che danno luogo a cambiamenti conformazionali che favoriscono l’interazione e la conseguente infezione virus-cellula target.

Sulla base di quanto descritto le proteine poste sulla superficie virale potrebbero essere un importante mezzo per indirizzare l’infezione verso specifiche famiglie cellulari.

In alcuni casi l’ingegneria genetica è arrivata a sostituire le proteine di membrana di un virus con proteine provenienti da altri virus in modo da favorire interazioni specifiche. Ad esempio uno dei più comuni vettori retrovirali è il “lentivirus Simian Immunodeficiency virus” che viene rivestito con la proteina G proveniente dal “Vesicular Stomatitis virus”. Il virus così ingegnerizzato viene denominato “VSV G-pseudotyped lentivirus”

ed ha la proprietà di infettare un largo numero di cellule.

Sono stati fatti molti tentativi per creare, in questo modo, carrier virali capaci di indirizzarsi unicamente ad un tipo di cellule in modo da migliorare l'efficienza della terapia genica che altrimenti avrebbe bisogno di somministrazioni massive per consentire l'attività terapeutica.

Vettori non virali

Sebbene i vettori virali rappresentino ancora il metodo più efficace e diretto per la somministrazione di materiale genetico numerosi studi sono in corso per lo sviluppo di materiali di carattere sintetico in grado di proteggere e veicolare opportunamente il materiale genetico.

Vettori lipidici

Uno dei mezzi non virali utilizzati per la veicolazione del DNA è costituito dal materiale lipidico. Si tratta di strutture micellari costituite da membrane fosfolipidiche ben note come sistemi per il rilascio di farmaci (liposomi). Il DNA complessato con strutture lipidiche di questo tipo è denominato Lipoplex. Questi complessi possono essere anionici, neutri o cationici. Lo sviluppo di queste forme si è indirizzato verso i Lipoplex cationici in quanto questi, grazie alla loro carica positiva, si complessano spontaneamente con il DNA caricato negativamente. La presenza di una carica positiva sarà la caratteristica principale di tutti i vettori non virali che andremo ad analizzare.

La carica dei Lipoplex favorisce l'interazione della membrana con la cellula, la successiva endocitosi ed allo stesso tempo protegge il DNA dalla degradazione da parte degli enzimi citoplasmatici.

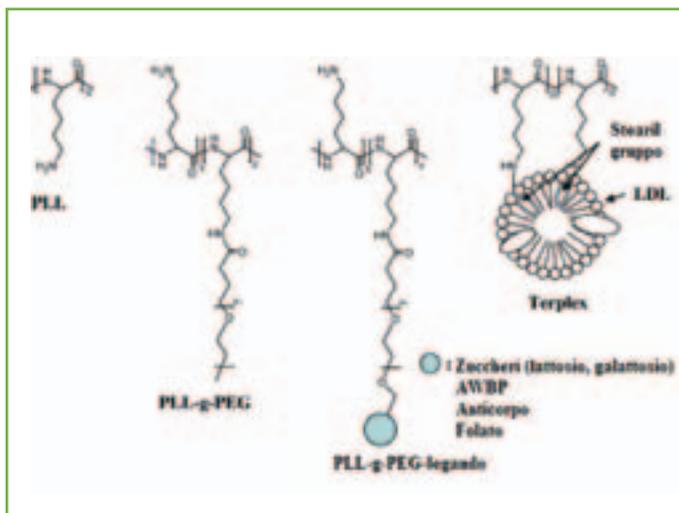


Fig. 2 - Struttura chimica di derivati di PLL usati come vettori per geni. PEG = polietilenglicole; AWBP= proteina che si lega alla parete arteriosa ("arterial wall binding protein"); LDL= lipoproteina a bassa densità (da [1])

Polimeri sintetici

L'utilizzo della Poli(L)lisina (PLL) è stato proposto in seguito alla scoperta della formazione di complessi polielettrolitici nanoparticellari con il DNA. Ciò è dovuto all'interazione dei gruppi amminici della lisina, protonati in ambiente fisiologico, con le cariche negative dei gruppi fosfato del DNA. Il loro uso è limitato dalla tossicità e dalla stabilità dei complessi. Il contatto con le cellule di questi complessi è mediato dall'assorbimento aspecifico con le proteine di membrana.

Le caratteristiche cationiche dei complessi sono la principale causa della tossicità. Inoltre la caratteristica della carica può indurre adsorbimento alle proteine plasmatiche con rapida eliminazione ("clearance") dei complessi. Per ovviare a ciò e prolungare la stabilità nel plasma, i complessi sono stati funzionalizzati mediante derivati del polietilenglicole (PEG). Inoltre, per conferire specificità verso particolari tessuti sono stati realizzati derivati anche con zuccheri, proteine e anticorpi, come riportato nella Fig. 2 [1]. Recentemente Kataoca *et al.* [2] hanno realizzato complessi micellari costituiti da copolimeri PLL-PEG nei quali il complesso PLL e il DNA formano un nucleo idrofobico ed il PEG forma uno strato superficiale idrofilo. Il rivestimento di PEG non solo stabilizza il complesso ma protegge il DNA dalla degradazione enzimatica.

Ciò è stato dimostrato dall'espressione del gene luciferasi che è proseguita nel fegato per tre giorni dopo la somministrazione sistemica nell'animale [3]. Diversamente dai vettori virali i vettori polimerici non possiedono affinità specifiche verso determinati tipi cellulari. Per questo motivo molti tentativi di indirizzarli ("targeting") verso specifici bersagli sono stati sperimentati.

Ad esempio PLL, coniugata con lattosio, ha evidenziato un notevole aumento di capacità di trasmissione del materiale genetico in cellule epatiche [4]. Inoltre l'efficienza di indirizzo verso il fegato è stata del 60% con limitatissima localizzazione del DNA negli altri tessuti.

Un altro esempio di "targeting" è quello che ha utilizzato AWBP, una proteina che contiene il sito di legame alla parete delle arterie di una delle proteine del LDL.

Interagendo con il DNA, PLL-g-PEG-AWBP forma complessi sferici di dimensioni di 100 nm, mostrando un'alta efficienza di trasmissione del materiale genetico alle cellule dell'endotelio aortico [5]. Il recettore folato è stato identificato come potenziale sito di target in varie cellule tumorali, essendo espresso in modo anormale in numerosi tipi di tumore.

Per questo motivo la derivatizzazione del vettore con il folato è stata ipotizzata come mezzo per veicolare il materiale genetico direttamente alle cellule cancerose.

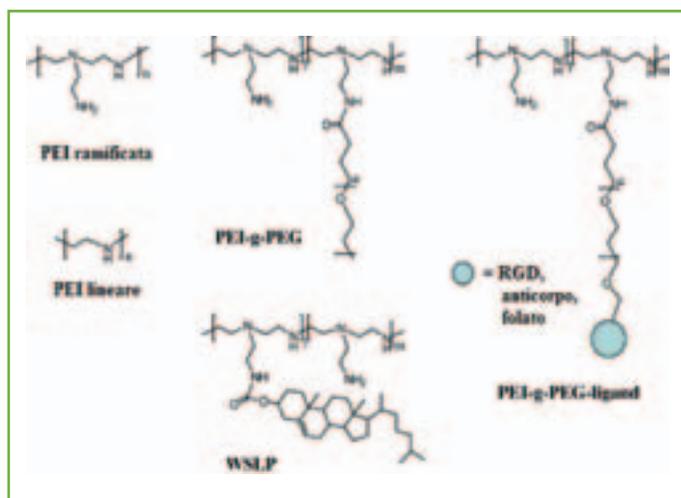


Fig. 3 - Struttura chimica di derivati di PEI usati come vettori per geni. WSLP= lipopolimero idrosolubile; RGD= un peptide contenente la sequenza aminoacidica Agr-Gly-Asp (da [1])

Sono stati realizzati sistemi PLL-Folato e PLL-g-PEG-Folato che hanno dimostrato una notevole specificità ed efficienza, se comparati a vettori non derivatizzati, nell'infettare specifiche linee tumorali [6]. Un altro sistema di vettore specifico dei geni è un sistema definito Terplex che sfrutta le proprietà delle LDL di interagire con specifici recettori su molti tipi di cellule come miociti, epatociti ed endotelio.

Il derivato stearyl-PLL viene ottenuto per N-alcilazione del PLL con stearyl bromuro e fatto interagire con il DNA per formare complessi. Tale complesso interagisce con le LDL mediante interazione idrofobica originando così il sistema Terplex.

In un modello animale di infarto miocardico tale sistema utilizzato per la trasmissione di uno specifico gene si è dimostrato efficiente nel migliorare la funzionalità cardiaca [7].

Altri materiali polimerici utilizzati come vettori nella terapia genetica sono quelli a base di polietilenimina (PEI) riportati nella Fig. 3 [1]. La molecola di base di tale sistema contiene ammine primarie, secondarie e terziarie che sono protonate in ambiente fisiologico. Le caratteristiche cationiche permettono l'interazione con il DNA sotto forma di particelle ad alta densità. La tossicità di tali complessi è stata modulata mediante coniugazione con PEG, la possibilità di indirizzo verso specifiche specie cellulari è stato realizzato in vari modi: a) alle cellule endoteliali mediante derivatizzazione con una integrina che lega il peptide RGD; b) a vari tipi di tumore mediante legame a specifici anticorpi (ad esempio il frammento legante l'antigene (Fab) dell'anticorpo OV-TL16, che riconosce antigeni di superficie espressi nel cancro delle ovaie, è stato legato ad un frammento PEI-g-PEG e complessato con il DNA ed ha mostrato maggiore efficienza nell'espressione genetica di cel-

lule tumorali rispetto al polimero senza la molecola target [8]. La maggior parte dei materiali polimerici fin qui descritti hanno strutture non soggette a degradazione in ambiente fisiologico; di conseguenza tali vettori polimerici presentano il rischio di accumulo nei tessuti e possibile tossicità. Per superare questo problema sono stati quindi sintetizzati diversi polimeri biodegradabili che presentano uguale o addirittura maggiore efficienza di trasmissione del materiale genetico, ma minore tossicità. Alcune di queste molecole sono riportate nella Fig. 4 [1].

Polisaccaridi

Un esempio interessante di vettore non virale è costituito dalle ciclodestrine. Per l'utilizzo come vettori in terapia genetica sono state realizzate β -ciclodestrine polimeriche con caratteristiche cationiche, come riportato nella Fig. 5 [1]. L'interazione tra questi polimeri ed il DNA porta alla formazione di complessi compatti di dimensioni intorno a 150 nm con un'efficienza di trasmissione dei geni alla cellula comparabile agli altri materiali non virali descritti e con una bassissima tossicità. Non si è osservata infatti mortalità nel topo fino alle dosi di 200 mg/kg per via endovenosa ed intraperitoneale.

Un altro polisaccaride utilizzato come vettore non virale è costituito dal chitosano (Fig. 6) e dai suoi derivati. Questi prodotti hanno una tossicità irrilevante (LD 50 nel ratto è 16 g/kg) e sono degradati in ammino zuccheri all'interno dell'organismo [10]. La presenza di ammine primarie conferisce loro le caratteristiche cationiche che favoriscono la complessazione e l'introduzione nelle cellule. L'interazione con il chitosano protegge inoltre il DNA dalla

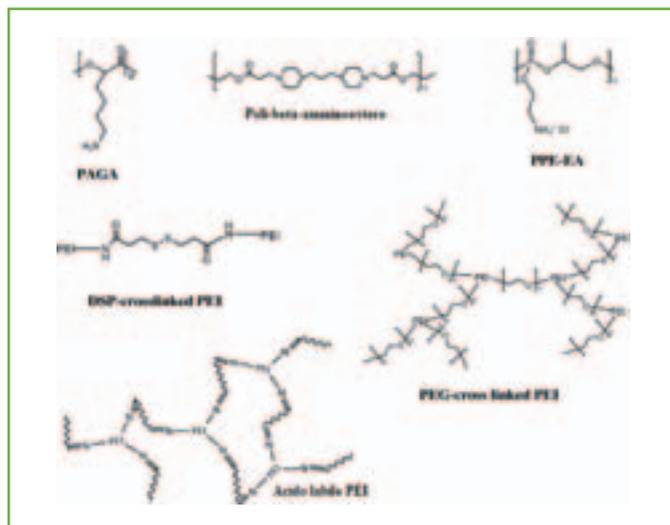


Fig. 4 - Struttura chimica di polimeri cationici biodegradabili usati come vettori per geni. PAGA = poli(α -[4-aminobutil]-acido L-glicolico); PPE-EA = poli(2-amminoetil propilene fosfato); DSP= ditiobis(succinimidilpropionato) (da [1])

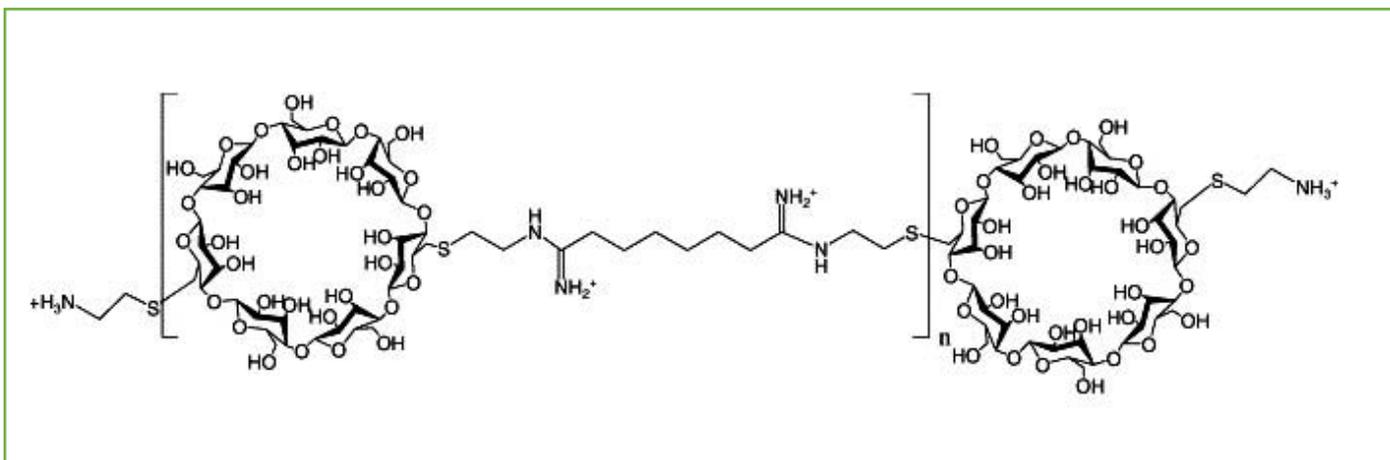


Fig. 5 - β -ciclodestrine funzionalizzate (da [1])

degradazione degli enzimi presenti nell'interno della cellula. La solubilità del chitosano dipende dal peso molecolare (PM). A basso PM (22 kD) è solubile in ambiente fisiologico mentre ad alto peso molecolare è solubile solo in acidi diluiti. Le ulteriori e ben note proprietà mucoadesive del chitosano ne hanno fatto ipotizzare l'uso per vie di somministrazione inusuali per la terapia genetica: orale e nasale. Nanoparticelle costituite da chitosano complessato con pArah2 (plasmide che contiene il DNA specifico di una proteina responsabile delle reazioni anafilattiche nell'allergia da arachidi) somministrate a scopo profilattico per via orale riducevano in maniera significativa la risposta anafilattica nel topo dopo somministrazione diretta dell'antigene [10].

Applicazioni cliniche: delusioni e prospettive future

Nonostante le prime applicazioni terapeutiche con materiale di derivazione genetica risalgano fino ai primi anni Novanta la terapia genetica ha sofferto di molti insuccessi ed è ancora ben lontana da un'applicazione assodata. Ciò può essere correlato a due motivazioni principali:

- la tecnologia di delivery.* Abbiamo visto come la somministrazione ed incorporazione di frammenti di DNA al posto giusto ed al momento giusto sia un'impresa che spesso va al di là delle attuali conoscenze. I virus sono stati giustamente ipotizzati come il mezzo ideale per "infettare" una cellula, considerato che è ciò che comunemente fanno. Ma i virus sono il risultato di una selezione naturale e di un perfezionamento in corso da milioni di anni; l'ingegneria operata dall'uomo per trasformarli in veicoli pacifici destinati al trasporto di agenti terapeutici rischia di essere un mezzo irto di pericoli sconosciuti, considerando l'imperfetta conoscenza dell'"arma" che stiamo manipolando;
- il funzionamento dei geni.* Come si è già accennato molto

raramente abbiamo la situazione di una singola alterazione su un singolo gene che dà luogo ad una sindrome ben definita.

Il risultato finale di qualsiasi evento fisiologico è sempre causato dall'interazione contemporanea di numerosi geni e fattori, il cui meccanismo fine è ancora sconosciuto.

Un intervento grossolano di un "pezzo di DNA" inserito a caso nel genoma della cellula target è qualcosa di cui non possiamo ancora comprendere a pieno l'effetto.

Ad oggi il più eclatante successo della terapia genetica è stato il trattamento di bambini affetti da una severa immunodeficienza genetica (X-SCID) detta anche "bubble boy syndrome". In uno studio clinico svolto al Hopital Necker Enfants a Parigi 11 bambini hanno ricevuto l'autotrapianto del midollo dopo che lo stesso era stato corretto *ex-vivo* con l'introduzione del gene sano (IL2RG che regola lo sviluppo del sistema immunitario) attraverso un retrovirus. All'inizio l'effetto della terapia sembrò miracoloso con il totale ripristino del sistema immunitario negli 11 pazienti. Alcuni anni dopo 3 bambini svilupparono una sindrome leucemica, in un caso caratterizzata dalla proliferazione

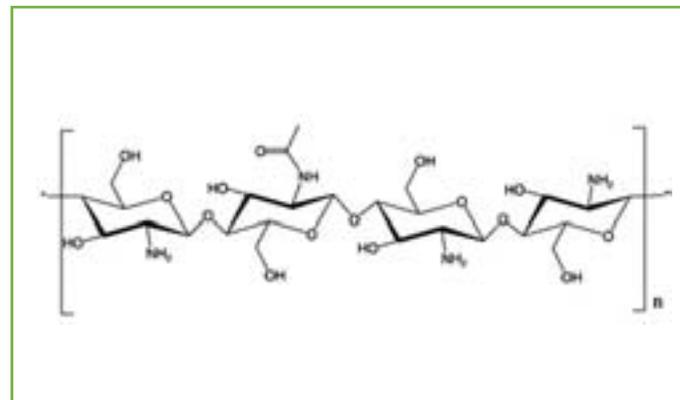


Fig. 6 - Chitosano

incontrollata di un tipo particolare di cellule T. I pazienti furono sottoposti a chemioterapia mentre gli altri nove furono considerati definitivamente guariti. I successivi approfondimenti dimostrarono che il retrovirus poteva inserire il gene in modo casuale nel DNA dell'ospite.

Nei casi descritti si era integrato nel cromosoma 11 in prossimità di un altro gene (LMO-2) frequentemente associato con la leucemia e probabilmente attivandolo. Poiché studi clinici simili erano stati attivati in diversi paesi alcune autorità sanitarie decisero di interrompere la terapia mentre altre decisero di consentirla con un'attenta selezione dei pazienti, considerando determinante il rapporto rischio-beneficio. Bisogna infatti considerare che la malattia in oggetto è incurabile a meno di un trapianto di midollo con un donatore perfettamente compatibile e generalmente porta alla morte nel primo anno di vita i bambini che ne sono affetti [11].

Più recentemente approfondimenti fatti sull'animale presso il Salk Institute (La Jolla, California) hanno dimostrato che dopo trattamento con il gene IL2RG implicato nella X-SCID circa un terzo degli animali trattati, nel corso della loro vita (1,5 anni per i topi) sviluppava una malattia simile al linfoma [12].

Con questi presupposti l'ipotesi della terapia genetica come farmaco commerciale è ancora ben lontana, considerando il grado di sicurezza necessario in questo caso.

Numerosi studi, con risultati incoraggianti, continuano comun-

que in tutto il mondo. Ricercatori del Thomas Jefferson College dell'Università di Filadelfia [13] hanno trattato ratti con insufficienza cardiaca con un gene S100A1 veicolato con un adenovirus modificato con la presenza di un promotore genetico specifico per le cellule cardiache in grado di fornire un targeting specifico. Bassi livelli della proteina S100A1 sono critici per la funzionalità cardiaca. I ratti trattati attraverso le coronarie mostrarono un significativo miglioramento dell'attività cardiaca rispetto ai ratti non trattati. In un altro studio ricercatori del California Institute of Technology [14] hanno dichiarato di avere ottenuto risultati promettenti nel rallentare la crescita tumorale in topi trattati con ciclodestrine policationiche veicolanti SiRNA, un tipo di RNA che è in grado di disattivare geni specifici implicati in certe forme tumorali.

Quanto descritto, benché ancora lontano da una completa realizzazione nonostante gli sforzi quasi ventennali, non può essere considerato una sconfitta, soprattutto perché alcuni pazienti, che non avevano speranze, stanno conducendo una vita normale. È invece un messaggio per indicarci che la comprensione completa dei meccanismi genetici è ancora ben lontana e la cautela accompagnata dalla ricerca di base deve essere il principale *modus operandi*. La terapia mirata attraverso la completa comprensione dei meccanismi genetici resta comunque uno dei futuri più promettenti della medicina, che richiede tuttavia un contributo pluridisciplinare.

Bibliografia

- [1] T.G. Park *et al.*, *Adv. Drug. Delivery Reviews*, 2006, **58**, 467.
- [2] Kataoka *et al.*, *Bioconjug. Chem.*, 1997, **8**, 702; *Nippon Rinsho*, 1998, **56**, 718.
- [3] Kataoka *et al.*, *Gene Therap.*, 2002, **9**, 407.
- [4] Hashida *et al.*, *J. Contr. Release*, 1998, **53**, 301.
- [5] Kim *et al.*, *J. Contr. Release*, 2002, **78**, 273.
- [6] Park *et al.*, *Macromol Biosci.*, 2005, **5**, 512.
- [7] Kim *et al.*, *J. Contr. Rel.*, 2003, **93**, 175.
- [8] Kopacek, *Bioconjug. Chem.*, 2003, **14**, 989.
- [9] Sharma *et al.*, *Biomater. Artif. Cells Artificial Organs*, 1990, **18**, 1.
- [10] Roy *et al.*, *Nat. Med.*, 1999, **5**, 558.
- [11] Berns, *New Engl. J. Med.*, 2004, **350**, 1679.
- [12] Salk Institute Press Release, April 26, 2006.
- [13] Thomas Jefferson University News Release, May 23, 2006.
- [14] NSTI Nanotech 2007 Conference in Santa Clara (CA).

Gene Therapy: Problems and Current Applications

In the last decades the knowledge in gene codes, mechanism of action and link between gene mutation and disease improved in a very impressive way. This grow of knowledge originated the idea to use genes administration as a powerful tool to fight every kind of disease linked to gene alteration. Very soon scientists realized that genes were very different from conventional drugs for pharmacokinetic and pharmacodynamic reasons: first of all they need a carrier to reach their intracellular target. The different types of carriers, viral and non-viral, are reviewed remarking the pros and cons of each group. Some information on the current status of gene therapy clinical application is reported. Up to now the main success is the cure of a rare genetic disease ("bubble boy syndrome") which does not allow the development of a working immune system in children. The possibility of severe side effects in some children cured is also discussed.