

David Lillicrap: Buongiorno, sono David Lillicrap. Insegno nel reparto di Patologia e Medicina molecolare presso la Queen's University in Canada e vi presenterò una serie di diapositive sulla terapia genica nell'emofilia. L'obiettivo di questa presentazione è di descrivere correttamente la terapia genica, inclusi i concetti e i termini di base.

Questa è una storia che inizia più di 65 anni fa. In questa diapositiva possiamo vedere una foto di Francis Crick, a destra, e James Watson, a sinistra, mentre osservano il loro elegante modello della doppia elica del DNA che hanno descritto a Cambridge nel 1953.

Spostiamoci rapidamente ai primi anni '80, quando è stato descritto il primo dei geni dei fattori della coagulazione. Questa è una notizia pubblicata in un articolo su Nature dal mentore Arthur Bloom, che descrive i vantaggi degli esperimenti di clonazione: una maggiore conoscenza della patogenesi dei disturbi emorragici, l'avanzamento della diagnosi e, infine la terapia genica, ciò di cui tratteremo in questa presentazione.

Il principio della terapia genica è relativamente semplice. Prevede l'inserimento di un transgene terapeutico nelle cellule, dove il DNA è integrato nel nucleo. Il nucleo esprime quindi l'mRNA che viene convertito in proteina. Quest'ultima resta all'interno della cellula o viene secreta e circola nell'organismo conferendo un beneficio terapeutico.

Prima di proseguire con la descrizione dettagliata del processo di terapia genica, è importante sottolineare che, attualmente, la terapia genica è limitata alle cellule somatiche. Ciò significa inserire un gene normale o riparare un gene all'interno delle cellule di un soggetto che non andrà a vantaggio delle generazioni successive. La terapia genica delle cellule somatiche è limitata a un soggetto e non va a modificare o alterare il DNA delle cellule germinali.

In questa diapositiva possiamo vedere un elenco di patologie che sono sempre state ottime candidate per la terapia genica. Notiamo disturbi monogenici, in cui il fenotipo clinico è dovuto principalmente a difetti a carico di un singolo gene e l'emofilia ne fa parte. L'emofilia è una buona candidata perché, come sappiamo, anche piccoli incrementi del fattore della coagulazione determinano significativi vantaggi clinici. La proteina viene secreta dalla cellula, pertanto, deve solo entrare in circolo e non è necessaria un'espressione completa della proteina. Disponiamo di ottimi modelli animali in cui è possibile testare l'efficacia della terapia genica, ad esempio topi e animali di grande taglia.

In questa diapositiva si può vedere che sono disponibili quattro opzioni per la terapia genica delle cellule somatiche. La prima di queste è la riparazione della mutazione, di cui parleremo più dettagliatamente nella diapositiva successiva. Poi, abbiamo la possibilità di inserire un transgene con vettori



non virali. Sono vettori teoricamente utilizzabili ma non si adattano alla pratica clinica. Poi, abbiamo una terapia genica basata su cellule, che approfondirò in una delle diapositive successive. Infine, il trasferimento del gene con un vettore virale, che è la strategia più utilizzata in tutti gli studi sulla terapia genica dell'emofilia attualmente in corso negli esseri umani.

Questa diapositiva mostra la potenziale alterazione o riparazione dei geni tramite strategie di modifica del gene. A sinistra vediamo la possibilità di una ricombinazione omologa come metodo di riparazione dei geni. Ciò è teoricamente possibile ma si tratta di un processo poco efficiente. A destra vediamo invece diversi approcci basati sull'attività di una nucleasi. Guardando da sinistra verso destra, abbiamo diverse strategie mediate da nucleasi "zinc-finger", TALENs o CRISPR. La nucleasi viene diretta tramite acidi nucleici o proteine in una regione del genoma dove avviene una rottura della doppia elica (ora stiamo osservando la parte inferiore della diapositiva). La rottura della doppia elica è riparata in diversi modi. Questi studi potenzialmente possono essere messi in pratica (stanno per essere analizzati nell'ambito di studi clinici) ma per l'emofilia ritengo che, sebbene l'analisi possa essere eseguita in vitro e in modelli animali, siano ancora un po' distanti dall'applicazione clinica.

Quali sono gli elementi da valutare per una strategia della terapia genica? Sono elencati in questa diapositiva. Parlerò del transgene terapeutico, del sistema di trasferimento e della cellula ospite appropriata, quindi delle misurazioni dell'espressione della proteina transgenica.

Che aspetto ha la cassetta del transgene? Generalmente, contiene una sequenza codificante di DNA, in cui mancano gli introni. La maggior parte di queste sequenze codificanti di DNA sono nell'ordine di grandezza di 2-7 chilobasi. In un'altra diapositiva illustrerò due metodi con cui possiamo modificare la sequenza codificante.

L'ottimizzazione del codone è descritta in questa diapositiva: è la modifica della sequenza della tripletta, ossia tre nucleotidi che insieme codificano gli amminoacidi, ma senza modificare nulla nella sequenza di questi ultimi. L'obiettivo di questa particolare strategia è migliorare il livello di trascrizione dell'mRNA, ottimizzare il processamento dell'mRNA e lo splicing di qualsiasi elemento intronico rimanente. Infine, ottimizzare la traduzione dell'mRNA in proteina utilizzando gli RNA di trasferimento che sono preferenzialmente presenti nella cellula ospite target.

Gli altri 2 gruppi di elementi richiesti nella cassetta transgenica sono alcuni elementi regolatori all'estremità 5' del transgene. Sono i promotori della trascrizione che potrebbero essere specifici di un certo tipo di cellula o specifici di una fase dello sviluppo o persino inducibili da farmaco. Abbiamo poi elementi più distanti che sono necessari per migliorare l'espressione



genica, i cosiddetti elementi potenziatori che, ancora una volta, dobbiamo abbinare a un particolare tipo di cellula ospite.

Quindi, all'altra estremità della cassetta transgenica, abbiamo la sequenza 3' che generalmente serve a stabilizzare l'RNA messaggero che viene trascritto dalla sequenza codificante del DNA.

Le prossime due diapositive illustrano le strategie generali per l'inserzione del transgene. La prima di queste descrive il trasferimento diretto del gene in vivo in cui il transgene viene inserito mediante infusione endovenosa o, quando possibile, tramite iniezione intramuscolare. I vantaggi stanno nella semplicità pratica: richiede poco tempo sia per il medico sia per il paziente. Gli svantaggi stanno invece nella possibile risposta immunitaria dell'organismo verso il vettore di trasferimento del transgene di cui discuteremo più avanti. La seconda questione sta nel fatto che è presente un'efficienza variabile, e la possibilità che potrebbe trasferire il transgene in alcuni tipi di cellule che si preferirebbe evitare.

La seconda strategia per l'inserzione del transgene è mostrata in questa diapositiva. È descritta come un trasferimento genico indiretto o ex vivo in cui il transgene viene inserito esternamente all'organismo. Potete vedere a sinistra della diapositiva che la prima cosa da fare è prelevare o isolare cellule staminali o progenitrici autologhe a lunga emivita dal paziente. Una volta isolate queste cellule, è necessario inserire una copia normale del gene mutante nel paziente oppure modificare il gene mutante presente all'interno delle cellule del paziente. Tali cellule geneticamente modificate vengono quindi espanse all'esterno dell'organismo per poi essere reintrodotte nel paziente, dove trovano un luogo in cui insediarsi e produrre il fattore normale (nel caso dell'emofilia, il fattore di coagulazione normale), che è assente nelle cellule del paziente.

Questo sistema di trasferimento presenta numerosi vantaggi ma anche punti deboli. I lati positivi stanno nel fatto che non vi è esposizione del vettore in vivo, molto importante dal punto di vista immunologico. Avviene scegliendo direttamente la cellula bersaglio e, quindi, le uniche cellule che vedono il vettore e il nuovo transgene sono quelle che sono state prelevate e manipolate all'esterno dell'organismo. Gli svantaggi risiedono nella procedura particolarmente laboriosa. Richiede infatti strutture speciali. Inoltre, è necessario che l'organismo si sottoponga a un processo di condizionamento per accogliere le cellule geneticamente modificate che devono essere reimpiantate in maniera corretta.

Tutti gli attuali studi sulla terapia genica nell'emofilia coinvolgono il trasferimento del gene con un vettore virale, sono disponibili tre tipi di virus che vengono utilizzati: adenovirus, retrovirus e virus adeno-associati.



Ho preparato un'unica diapositiva per discutere degli adenovirus. È stato trattato un unico paziente con questo sistema di vettore virale. È altamente efficiente nella trasduzione di cellule proliferanti e quiescenti ed è possibile creare grandi quantità di questo vettore in maniera relativamente semplice. I notevoli svantaggi del trasferimento del gene adenovirale stanno nella significativa risposta immunitaria innata verso questi vettori. Quindi, si ha un notevole innalzamento delle citochine pro-infiammatorie, tossicità per il fegato, trombocitopenia e, in casi estremi, si può sviluppare una sindrome della risposta infiammatoria sistemica che talvolta può essere letale. Non è un sistema di trasferimento adatto a pazienti affetti da emofilia nella sua forma corrente.

Il secondo sistema di trasferimento basato su virus è quello del trasferimento del gene mediato da lentivirus, che è oggetto di analisi da parte di alcuni gruppi per l'utilizzo clinico nell'emofilia. I vettori lentivirali trasducono sia le cellule proliferanti che quelle quiescenti. La capacità del vettore, ossia la dimensione dell'inserzione del transgene da inserire, è abbastanza grande con una dimensione massima di 8 chilobasi. Si verificano risposte immunitarie innate nei minori. Un vantaggio del sistema lentivirale sta nel fatto che vi è un'integrazione genomica stabile che sembra essere casuale e non di natura oncogenica, almeno in base agli ampi studi che sono stati eseguiti in modelli animali.

Infine, il terzo dei sistemi di vettore virale è un virus adeno-associato. La diapositiva mostra un'immagine al microscopio elettronico di piccole particelle AAV. Verso il centro della diapositiva potete vedere una grande particella adenovirale. Si tratta del sistema del vettore virale utilizzato in tutti gli attuali studi sulla terapia genica nell'emofilia.

Il virus AAV, come lo chiamerò d'ora in poi, è un parvovirus umano non patogeno. Si tratta di un genoma a DNA a singola elica, mostrato nella parte superiore di questa diapositiva. Ha dimensioni pari a 4,7 chilobasi e presenta due regioni codificanti: un gene rep e un gene cap. Il genoma viene protetto ad entrambe le estremità da sequenze di ripetizioni terminali invertite. Questo sistema di vettore virale induce un'immunità innata minima. Sono presenti diversi sierotipi, rappresentati dalle differenti proteine del capsido. Una percentuale davvero minima del vettore ricombinante si integra nel genoma ospite e la maggior parte del vettore esiste come concatameri circolari extracromosomiali stabili.

Questa diapositiva illustra il modo in cui convertire un genoma AAV di tipo non mutato in un genoma del vettore terapeutico AAV. Vengono rimossi i geni rep e cap e come vediamo, nel secondo diagramma qui sotto, è presente il genoma del vettore AAV che ora ha un gene terapeutico sul lato destro e un promotore o una sequenza regolatoria che guida l'espressione in



un particolare organo o tipo di cellula. Sempre in questa diapositiva, è presente un promotore specifico per il fegato che guiderebbe l'espressione di questo transgene negli epatociti. Attualmente, per l'emofilia è l'organo in cui tutti i vettori vengono indirizzati. Nella parte inferiore della diapositiva, vediamo le diverse grandezze del transgene che variano tra il fattore 9, dove la sequenza codificante di DNA è di circa 1,3 chilobasi di dimensione e il fattore 8 che, una volta rimossa la sequenza codificante del dominio B è di circa 4,7 chilobasi.

Come si crea una particella del vettore AAV? Troviamo la risposta in questa diapositiva. Nella parte superiore della diapositiva vediamo la sequenza degli acidi nucleici transgenici con le sequenze ITR che sono state mantenute alle estremità 5' e 3' del transgene. La sequenza del promotore e del gene transgenico sono al centro e vengono inserite nel capsido del vettore AAV per creare una particella del vettore AAV: sono queste particelle a essere iniettate nel paziente, nel fegato, ossia il materiale terapeutico.

Qui è illustrato più dettagliatamente. La particella interagisce con la membrana della cellula ospite mediante alcuni recettori. Il meccanismo funziona abbastanza bene ma esistono ancora alcune lacune nelle nostre conoscenze. La particella viene assorbita in un endosoma all'interno della cellula. Infine, la particella viene rilasciata dall'endosoma, la proteina del capsido viene frammentata ed espressa sulla superficie della cellula trasdotta, quindi l'acido nucleico transgenico rimane nel nucleo, dove esiste in forma di concatameri extracromosomiali o, in alcuni casi si integra nel DNA della cellula ospite.

Quindi, quando si mettono insieme tutti questi dati per l'emofilia, i componenti della strategia di trasferimento genico implica un transgene terapeutico che è di tipo non mutato o una sequenza cDNA del fattore 9 modificata, una sequenza del fattore 8 con delecto il dominio B. Abbiamo bisogno di una strategia di trasferimento, che attualmente è costituita dai virus adeno-associati, sebbene siano in corso studi, come già menzionato, che coinvolgono vettori lentivirali, che sono però ancora nella prima fase di sviluppo. Abbiamo bisogno di trasferirlo in una cellula ospite ricevente, al momento il fegato, e quindi dobbiamo capire se il trasferimento è efficace. Ciò coinvolge misurazioni dei livelli del fattore di coagulazione nel plasma, del numero annuale di emorragie e del consumo di fattore 8 esogeno da parte dei pazienti. Quindi, è chiaro che abbiamo bisogno anche di valutare la sicurezza.

Questa diapositiva rappresenta una versione del ciclo Hype sviluppato da Gartner per la terapia genica. Analizziamo i dati procedendo da sinistra verso destra. La spinta della tecnologia è iniziata negli anni '70 e possiamo vedere che nella parte superiore del picco qui, prima del 1990-1995, eravamo certi



che la terapia genica potesse dare ottimi risultati e, che quindi, alcune forme di disturbi da immunodeficienza ereditari, come il deficit di ADA, potessero essere curate con la terapia genica. Tuttavia, nel 1999 si è verificato un incidente: un paziente trattato mediante terapia genica adenovirale, Jesse Gelsinger, è morto a causa di una condizione infiammatoria sistemica e questo è stato davvero un momento di disillusione nello sviluppo di strategie di terapia genica.

Nonostante tutto, durante il decennio successivo, dal 2000 al 2010, il contributo delle scienze di base sullo sviluppo del vettore e sulla migliore conoscenza della risposta immunitaria all'erogazione di una terapia genica ci ha portato a ciò che attualmente è un aumento della produttività. Questo è iniziato per l'emofilia verso il 2010/2011, con il primo successo clinico prolungato della terapia genica basata sull'emofilia e un significativo impegno biofarmaceutico nelle strategie di terapia genica. Ed eccoci nel 2019, anno in cui una serie di studi clinici di fase 3 stanno partendo sia per l'emofilia A che per l'emofilia B.

Questa è l'ultima diapositiva e descrive la promessa di una terapia genica per l'emofilia. Nella parte superiore abbiamo una descrizione degli effetti sull'emostasi con terapia sostitutiva con prodotti standard, la terapia sostitutiva con prodotti con emivita estesa, la terapia non-sostitutiva e, a destra, la possibilità di ciò che può verificarsi con una terapia genica. Nella parte inferiore della diapositiva, vediamo i livelli del fattore di coagulazione che possono essere misurati in circolo. Quindi, se volgiamo la nostra attenzione alle informazioni sulla sinistra, vediamo che vi sono picchi e concentrazioni minime intermittenti dei livelli del fattore che corrispondono ai miglioramenti e quindi alle riduzioni dei miglioramenti dell'emostasi. Questo è ciò che succede in ragione delle emivite delle proteine in circolo.

Questi vantaggi sono stati migliorati con fattori con emivita estesa, fattori EHL e, come possiamo notare dalla seconda serie di dati, i risultati nell'emostasi e con i livelli del fattore. Spostandoci ancora più a destra, verso le terapie senza fattore, questi fattori non migliorano i livelli del fattore di coagulazione perché non utilizzano fattori di coagulazione standard in circolo ma migliorano i livelli dell'emostasi globale, come potete vedere nella parte superiore del grafico.

Quindi, sul lato destro della diapositiva, si osserva ciò che possiamo ottenere con la terapia genica. Pertanto, la terapia genica promette di incrementare i livelli dei fattori di coagulazione individuali, il fattore 9 e il fattore 8, a livelli significativi dal punto di vista terapeutico, e quelli che sono persistenti a causa dell'espressione continua del fattore 9 e del fattore 8 dai transgeni terapeutici che sono stati introdotti. Questi dovrebbero essere più che



adeguati per ottenere una profilassi a lungo termine con rare occasioni di infusione del fattore di coagulazione.

