

LE BIOTECNOLOGIE

NELLO SVILUPPO DELLA TERAPIA GENICA

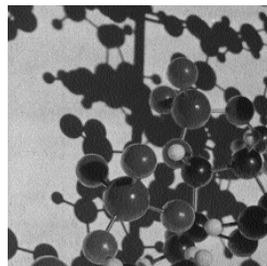
di Maria Cristina Speciani

Il dibattito sulle applicazioni biotecnologiche occupa sempre più spazio sui giornali e alla televisione. Troppo spesso le informazioni sull'argomento vengono date con una sorta di «certezza» che la scienza risolverà al più presto tutti i problemi ancora aperti. Vale la pena di ripercorrere le tappe che hanno condotto ad applicare all'uomo, nella cura delle malattie, le conquiste dell'ingegneria genetica. Per riscoprire come gli scienziati si sono posti di fronte alle loro scoperte e ai criteri con cui utilizzarle per migliorare la salute dell'uomo.

A un convegno tenuto a Milano nel gennaio di quest'anno, Giorgio Poli¹, affermava che «l'ingegneria genetica, oltre a rappresentare la tecnica più affascinante, pare essere la più promettente per i mezzi che sta offrendo per risolvere alcuni dei problemi che assillano l'umanità e, in particolare, quelli relativi alla diagnosi, terapia e prevenzione delle malattie dell'uomo e degli animali, alla produzione di alimenti di origine vegetale e animale, migliorati per produttività, qualità e salubrità, che promettono soluzioni anche per i Paesi più poveri, o al disinquinamento ambientale e allo sviluppo di nuove fonti energetiche.»

Su diverse riviste «scientifiche» possiamo trovare «informazioni» relative a questi argomenti, ma spesso presentate in modo estremamente schematizzato, come una serie di tecniche già ampiamente sperimentate con cui l'uomo può manipolare a suo piacere gli esseri viventi.² Solo in alcuni casi (cfr. *Le Scienze* n. 349, settembre 1997 o *La Recherche* n. 315, dicembre 1998) lo stato della ricerca viene presentato in termini problematici, come effettivamente è, e come riconoscono i protagonisti della vicenda. Come sottolineava ancora Poli, occorre conoscere gli scopi delle biotecnologie, gli strumenti di lavoro e le metodiche impiegate nell'ingegneria genetica per seguire il dibattito attualmente in corso e, aggiungiamo noi, per pensare di comunicarlo a livello didattico.

Per questo riprendiamo l'itinerario di sviluppo delle biotecnologie nel corso degli ultimi vent'anni: un percorso che intreccia conquiste nel campo della biologia molecolare e storie personali di ricercatori; una serie di avvenimenti che si sono succeduti a ritmi incalzanti portando nel 1990 alla prima terapia genica sull'uomo e aprendo giorno dopo giorno nuove e imprevedibili prospettive.



¹Ordinario di Microbiologia e Immunologia Veterinaria, Docente di Immunologia del Corso di Laurea in Biotecnologie, Università di Milano.

²Cfr.: C.Serra, F. Capelli, *Gli architetti della vita*, in: *Newton* n. 10, ottobre 1998

«INSERIRE UN GENE IN UNA CELLULA NON È AFFATTO SEMPLICE.[...] I PRIMI INGEGNERI GENETICI ERANO RIUSCITI A INTEGRARE ALCUNI TRATTI ISOLATI DI DNA IN PLASMIDI BATTERICI E A REINSERIRE I PLASMIDI NEI BATTERI STESSI. [...] QUESTO APPROCCIO DIEDE UNA SPINTA NOTEVOLE ALLO SVILUPPO DELLE BIOTECNOLOGIE E PORTÒ, ALLA FINE DEGLI ANNI SETTANTA, ALLA SINTESI DEL PRIMO FARMACO PREPARATO CON L'INGEGNERIA GENETICA, L'INSULINA. MA TUTTO CIÒ FUNZIONAVA SOLTANTO IN PROVETTA, OPPURE IN BATTERI SEMPLICI E NEI LIEVITI. SE L'OBIETTIVO ERA VERAMENTE UN TRATTAMENTO GENICO PER LE MALATTIE DELL'UOMO, GLI STUDIOSI DOVEVANO TROVARE IL MODO DI INSERIRE DNA NELLE CELLULE DEI MAMMIFERI.»³

I primi passi



W. French Anderson

Già a metà degli anni Settanta centri come il *Salk Institute* e *Cold Spring Harbor* avevano cercato di inserire i geni in cellule di mammifero. All'inizio degli anni Ottanta, man mano che si isolavano nuovi geni, rimaneva aperto il problema di trovare tecniche nuove e efficienti per introdurli nelle cellule desiderate.

I protagonisti di questa fase operano nei grandi centri di ricerca americani: Paul Berg alla *Stanford University*, French Anderson ai NIH (*National Institutes of Health*) di Bethesda, Richard Mulligan al MIT (*Massachusetts Institute of Technology*). Ma, come vedremo, sarà determinante anche l'opera di Claudio Bordignon all'*Istituto Scientifico H San Raffaele* di Milano (che poi diventerà DIBIT).

Anche alcuni geni isolati in quegli anni saranno protagonisti della ricerca: il gene della timidina chinasi (TK), enzima essenziale per la formazione di nuove molecole di DNA, isolato da alcuni ricercatori del *National Cancer Institute* e dell'Università di Yale; quello della beta-globina (la metà dell'emoglobina), isolato da Thomas Maniatis⁴ un biologo molecolare che lavorava al *Caltech (California Institute of Technology)* di Pasadena e quello dell'adenosin deaminasi (ADA), isolato, tra gli altri, da John Hutton all'Università di Cincinnati (Ohio).

French Anderson, medico e ricercatore, aveva un progetto: curare la talassemia, provocata da copie difettose di beta-globina, inserendo nelle cellule il gene mancante.

Egli aveva sperimentato, senza successo, diverse tecniche di inserimento genico che avevano funzionato con i batteri e si era infine rivolto alla tecnica della microiniezione.⁵

Aveva anche inserito DNA contenente TK in fibroblasti di topo mancanti di quel gene (cellule «Lmeno»); coltivandole in un terreno HAT⁶, in cui le cellule prive di TK non si sviluppano, aveva visto che alcune erano sopravvissute. Ciò dimostrava che era possibile inserire il gene nella cellula sprovvista di TK e «guarirla» geneticamente.

Poi Anderson iniettò nelle stesse cellule il gene della beta-globina, che aveva ottenuto da Maniatis già clonato e pronto per essere manipolato in laboratorio, ma non riuscì a trovare alcuna prova della produzione di beta-globina umana nelle cellule di topo; quantità minime testimoniavano che il gene era entrato nelle cellule (i fibroblasti non ne producono per niente) ma qualcosa impediva la sintesi della proteina.

Pensare a una terapia genica per la talassemia in quella situazione era estremamente prematuro.

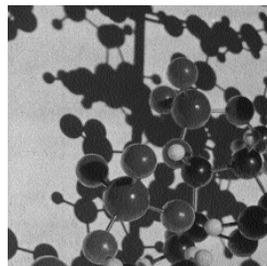
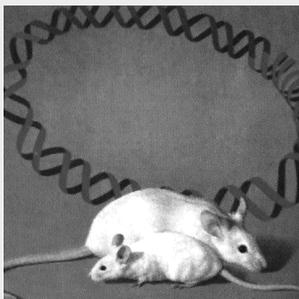
I primi animali transgenici

Il metodo della microiniezione era inadeguato per eventuali trapianti genici, ma contribuì allo sviluppo dei primi animali transgenici. Come aveva intuito Mario Capecchi, un biologo di base che lavorava dal 1977 all'Università dello Utah, si potevano iniettare geni nelle uova fertilizzate.

Nel 1980 Frank Ruddle, direttore della divisione di biologia dell'Università di Yale, iniettando un plasmide che conteneva il gene TK dell'*herpes* in ovociti di topo e impiantando le uova così trattate in madri adottive, dimostrò che era possibile ottenere animali transgenici: i geni TK erano presenti in tutte le cellule dei topi così ottenuti, ma non sembravano essere funzionanti.

Nel 1982 Ralph Brinster, dell'Università della Pennsylvania e Rochard Palmiter dell'Università di Washington a Seattle inserirono il gene per l'ormone della crescita di ratto all'interno di ovociti di topo: i topi che avevano subito la trasformazione pesavano circa il doppio del normale.

Un gruppo di Harvard inserì due oncogeni in un topo transgenico e ne risultò il primo animale brevettato: l'*Harvard Mouse*.



³L. Thompson, *Correggere il codice*, Garzanti, Milano 1998, p. 206.

⁴Aveva ricostruito il gene a partire dall'RNA messaggero usando la trascrittasi inversa e aveva sviluppato un metodo per la clonazione del DNA di cellule animali e umane usando una tecnica detta *shotgun cloning* (clonazione a tappeto).

⁵Sviluppata da Eliane Diacumakos alla *Rockefeller University* e basata sull'uso di un ago di vetro più sottile di un capello (un micron di diametro esterno) che veniva inserito nelle cellule operando al microscopio a ingrandimenti di circa duemila volte.

⁶Il terreno di coltura HAT, che contiene ipoxantina, aminopterina e timidina, non permette la crescita di cellule di mammifero mancanti di alcuni enzimi.

Intanto un gruppo di scienziati della *Columbia University* aveva messo a punto un metodo chimico per inserire i geni nelle cellule di mammifero: Richard Axel faceva precipitare il gene della timidina chinasi in una soluzione di fosfato di calcio favorendo così la sua penetrazione e la sua permanenza per centinaia di generazioni nelle cellule coltivate nel terreno HAT.

Iniziò una collaborazione tra la *Columbia* e il *Caltech*.

Il gene TK e il gene della beta-globina furono mescolati e inseriti in cellule di mammifero coltivate sul terreno HAT, ma solo un numero minimo di cellule conteneva entrambi i geni. Il problema

della tecnica, che sarebbe stata chiamata di Axel-Wingler, era la sua inefficienza: solo una cellula su un milione riusciva a acquisire il gene tramite la sua precipitazione con fosfato di calcio.

Il gruppo trovò piccole tracce di RNA messaggero prodotto dal gene della beta-globina, ma nessuna traccia di produzione della proteina. Era chiaro che i geni della beta-globina erano molto più complessi di quelli della TK e gli scienziati non riuscivano a interpretare la regolazione di questo gene. In seguito Maniatis spiegò che le sequenze strutturali non erano sufficienti per avviare la sintesi: l'espressione dei geni della globina è regolata da sequenze situate molto distanti dal gene strutturale.

Il caso di Martin Cline e il controllo degli esperimenti genici

Nel 1980, Martin J. Cline (1934-), affermato medico dell'Università della California di Los Angeles, era sicuro di aver trovato una terapia genica per la talassemia. In collaborazione con il dipartimento di biologia dell'UCLA stese un protocollo che sottopose agli organi di controllo che gli scienziati si erano dati in quegli anni. L'IRB (*Institutional Review Boards*), che all'interno di ogni centro universitario aveva il compito di proteggere i pazienti da esperimenti pericolosi e illegali, gli chiese di impegnarsi a non usare DNA ricombinante su pazienti.

Verso la fine del 1980, tra gli ematologi cominciarono a girare voci che Cline si fosse recato oltre oceano (in Israele e in Italia) per iniziare la sperimentazione genica sull'uomo scavalcando le linee guida statunitensi sul DNA ricombinante.

Nell'ottobre 1980 il *Los Angeles Times* pubblicò un articolo in cui si descriveva il lavoro di Cline in Israele, accompagnato da pronunciamenti di parecchi ricercatori convinti che lo studio fosse prematuro e che l'ingegneria genetica non avesse ancora raggiunto una fase abbastanza avanzata per giustificare esperimenti sull'uomo.

Alla fine Cline ammetterà di aver usato DNA ricombinante all'insaputa dei medici israeliani e sarà condannato come individualista che agisce senza controllo e al di fuori delle regole.

Il caso di Martin Cline ebbe molta risonanza in America, soprattutto perché metteva in crisi il sistema di controllo che gli scienziati avevano costruito negli anni Settanta e gli sforzi compiuti per assicurare la massima informazione e trasparenza sulla ricerca genetica.

In ogni modo, con questo scandalo si fece strada la consapevolezza che la tecnologia era disponibile e che presto i ricercatori l'avrebbero utilizzata.

La terapia genica non era più un capitolo del libro dei sogni, bensì una realtà che occorreva fronteggiare. E si riaccese il dibattito sui problemi etici legati alla manipolazione genetica.

Il 27 novembre 1980 il *New England Journal of Medicine* pubblica un articolo di French Anderson e John Fletcher (un bioetico dei NIH) intitolato: *Terapia genica negli esseri umani: quando diventa etico cominciarla?*

In esso gli autori avevano compiuto una revisione dello stato delle terapie geniche e dei contenuti etici che cominciavano a guidare le sperimentazioni sull'uomo. Poi stabilivano i criteri tecnici che dovevano essere accuratamente prima verificati sugli animali: «dimostrare che i nuovi geni sono stati inseriti nelle cellule bersaglio e che lì restano. Il nuovo gene deve essere regolato a dovere. La presenza del nuovo gene non deve danneggiare la cellula.»

La ricerca dei vettori per il trasferimento genico

Richard Mulligan



All'inizio degli anni Ottanta Richard Mulligan era un giovane ricercatore, ma aveva già realizzato importanti risultati. Come laureando, al MIT, aveva localizzato i geni di diverse proteine nel genoma del virus SV40 e aveva ottenuto dati sulla trascrizione e traduzione delle proteine. Dal 1976 al 1980 aveva lavorato con Paul Berg alla Stanford University dimostrando che era possibile far esprimere un gene batterico da cellule animali.⁷

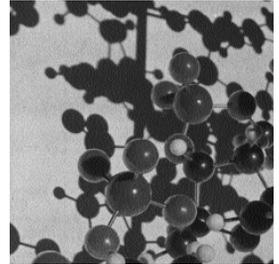
Successivamente, usando come vettore SV40 aveva inserito il gene della beta-globina di coniglio di Maniatis in cellule renali di scimmia che, di norma, non producono la proteina e ne aveva verificato la presenza con anticorpi monoclonali, con analisi chimica classica e con ricerche sull'RNA messaggero della globina. Purtroppo questo vettore, una volta entrato nelle cellule, le uccideva.

«ERA LA PRIMA VOLTA CHE QUALCUNO RIUSCIVA A METTER MANO FATTIVAMENTE ALLA MODIFICAZIONE GENETICA DI CELLULE SUPERIORI, LE STESSE DI CUI È COSTITUITO L'UOMO. ORA LA DISCUSSIONE SULLA TERAPIA GENICA UMANA SI POTEVA BASARE SU DATI CREDIBILI.»⁷

Berg e Mulligan erano consci dei problemi ancora aperti: un conto era mettere nuovi geni all'interno di cellule coltivate in provetta, un altro inserire geni funzionanti in una persona in carne e ossa. Berg era convinto che la nuova terapia dovesse ancora aspettare qualche decina di anni. Anche French Anderson riconosceva che non c'era ancora una tecnologia adeguata: nel giugno 1980, commentando i lavori di un convegno scientifico in cui si faceva il punto sulle terapie geniche disse:

«SI VEDEVA CHIARAMENTE CHE AVEVAMO ANCORA MOLTA STRADA DA FARE. ERA COME UNA CORSA IN CUI GIRI L'ANGOLO E CREDI DI ESSERE ALL'ARRIVO E INVECE IL PERCORSO CONTINUA FINO ALL'ORIZZONTE.»⁹

Nel 1980, concludendo il dottorato, Mulligan scrisse una relazione in cui prospettava la possibilità di ottenere una linea cellulare di retrovirus incapace di generare altri virus infettivi e quindi utilizzabili come vettori per una eventuale terapia genica. Il lavoro successivo compiuto da Mulligan al centro sul cancro del MIT avrebbe reso reale questa previsione.



⁷Frammentando il virus SV40 era riuscito a inserire un gene batterico (XGPR1) che era in grado di detossificare il terreno HAT in cellule di rene di scimmia: se il gene non produceva le proteine nelle cellule di scimmia queste, coltivate sul terreno HAT, sarebbero morte.

⁸L.Thompson, op. cit., p. 206.

⁹L.Thompson, op.cit., p. 210.

Nel febbraio 1982, al termine di un convegno «a porte chiuse» sulla terapia genica organizzato dal laboratorio di *Cold Spring Harbor*, a cui avevano partecipato i principali esperti del settore, Paul Berg concludeva: «Siamo giunti alla conclusione che le cure genetiche un giorno saranno disponibili. Ma, nel frattempo, prima che questo si possa verificare, occorre risolvere molti gravi problemi tecnici e sociali.» Durante la discussione era emerso che il sistema di trasferimento mediante vettori virali non era ancora sufficientemente a punto.

Ma si stavano facendo progressi.

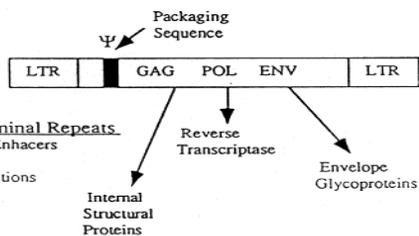
In modo indipendente Howard Temin (Università del Wisconsin a Madison) e Robert Weinberg del MIT formularono l'ipotesi che si potessero togliere i geni «dannosi» dai retrovirus in modo da poterli usare come vettori senza danneggiare le cellule in cui avveniva il trasferimento genico.

Nel 1982, Edward M. Scolnick¹⁰, in collaborazione con Anderson, aveva dimostrato che era possibile inserire il gene TK nei retrovirus e usarlo per trasferire il gene, ma la ricerca era stata abbandonata perché efficace solo in un esiguo numero di cellule.

Nel contempo, Richard Mulligan studiava il ciclo vitale dei retrovirus e in particolare le modalità con cui essi inseriscono le sequenze di DNA nei cromosomi in modo notevolmente stabile e senza uccidere la cellula.

Scoprì che il DNA virale copiato dalla trascrittasi inversa ha una sequenza LTR (*long terminal repeats*) a ogni estremità. Esse permettono ai geni virali di essere inseriti nei cromosomi della cellula infettata e obbligano gli enzimi della cellula a produrre l'RNA messaggero del virus. Tra le due regioni LTR sono presenti i geni virali strutturali GAG, POL e ENV.

Poi scoprì che, per produrre nuove particelle virali, è necessaria una sequenza particolare (PSI) che «impacchetta» l'RNA nel capside virale.



Posizione relativa delle sequenze nel genoma di un retrovirus

Era il passo fondamentale per ottenere il retrovirus vettore: bastava togliere la parte infettiva dei geni e inserire al loro posto i geni desiderati conservando le due sequenze essenziali LTR e PSI.

Mulligan riuscì a ottenere una serie di cellule (PSI2) che contenevano tutto il genoma virale tranne la sequenza PSI e le infettò con un secondo genoma retrovirale che conteneva le LTR, il segnale PSI di impacchettamento e il gene dell'*Escherichia Coli* che fabbrica l'enzima XGPRT (xantina guanina fosforibosil transferasi) che permette alle

cellule di sopravvivere nel terreno di coltura HAT.

I risultati, pubblicati nel numero di maggio 1983 della rivista *Cell*, provocarono molto scalpore. Era stata individuata una tecnica efficiente per introdurre i geni in cellule di mammiferi.

Sulla sequenza di impacchettamento PSI aveva cominciato a lavorare anche il gruppo dei NIH che faceva capo a Eli Gilboa, un rumeno che in Israele aveva studiato il virus SV40 e per primo aveva costruito il cDNA del genoma RNA del virus della leucemia di Moloney e l'aveva clonato in un plasmide batterico.

Nel 1982 il gruppo di Gilboa stava cercando di identificare la localizzazione della sequenza PSI (tra LTR di sinistra e GAG). In una serie di esperimenti in cui veniva usato il gene *neo* (resistenza alla neomicina) per l'identificazione cellulare, scoprì, forse casualmente, che la sequenza GAG incrementava la produzione delle proteine. Aveva così costruito il primo vettore retrovirale ad alta efficienza che venne chiamato «N2».

Nel corso del 1984, Mulligan manipolò geneticamente le proteine nell'involucro dei retrovirus di Moloney con geni di un altro virus in modo che tale ibrido fosse in grado di infettare anche cellule di scimmia e di uomo.

Era un ulteriore passo verso la messa a punto della terapia genica.

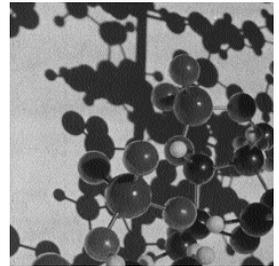
Verso le terapie geniche

I passi che portarono a sviluppare sistemi di trasferimento genico capaci di curare le malattie ereditarie nell'uomo ebbero come protagonisti non tanto singoli scienziati, ma interi gruppi di ricerca i quali ottennero risultati solo nell'interazione reciproca, anche se non sempre «pacifica».

Per esempio, all'UCLA di San Diego operava il gruppo di Theodore Friedmann¹¹, mentre al *Salk Institute* lavorava un gruppo che faceva capo a Inder Verma¹².

Nel 1982 il gruppo di Friedmann aveva isolato e clonato in cellule batteriche un frammento del gene umano HPRT (ipoxantina fosforibosil transferasi), le cui mutazioni nell'uomo provocano una sindrome di ritardo mentale chiamata di Lesh-Nyhan; l'aveva poi inserito, mediante un retrovirus vettore e usando la tecnica del fosfato di calcio, in cellule di topo che difettavano del gene. I risultati dell'esperimento, abbastanza soddisfacenti, furono pubblicati nell'agosto 1983 su *Proceedings of the National Academy of Science*.

In seguito, dopo aver stretto contatti con Mulligan (MIT) e Gilboa (NIH), il gruppo di San Diego tentò di «guarire» globuli bianchi prelevati da un malato di Lesh-Nyhan. I risultati, piuttosto deludenti perché le cellule in coltura producevano quantità minime di enzima, furono pubblicati nel giugno 1984 sul *Journal of Biological Chemistry*.



¹⁰Un medico ricercatore che lavorava al *National Cancer Institute* (NCI) e aveva scoperto che i retrovirus possono inserire l'oncogene in un'altra cellula trasformandola in tumore.

¹¹Aveva lavorato ai NIH, dal 1965 al 1969, sulla deficienza di HPRT. Poi, al *Salk Institute*, aveva studiato il poliomavirus e il suo uso per il trasferimento di geni. Tornato a San Diego, aveva sequenziato il genoma del polioma.

¹²Inder Verma (indiano) al *Salk Institute* aveva sequenziato *src* che provoca il sarcoma nel topo e aveva pensato di sostituirlo con un gene terapeutico.

I tentativi effettuati per curare geneticamente malattie come la sindrome di Lesh-Nyhan e la talassemia non avevano dato i risultati sperati. Perciò tra gli scienziati si diffuse la convinzione che occorresse rivolgersi a una malattia che coinvolgeva un numero ristretto di alterazioni geniche.

A Bethesda (NIH) Anderson e Gilboa, dopo aver inutilmente cercato di ottenere un'espressione di beta-globina dal vettore N2, all'inizio del 1984 cominciarono a dedicarsi alla deficienza di adenosina deaminasi che causa una malattia denominata SCID (*Severe Combined Immune Deficiency*).



Rappresentazione schematica di un retrovirus vettore

Nel settembre 1984 Anderson ottenne il gene per l'adenosina deaminasi (ADA) dal gruppo di John Hutton e, nel giro di qualche settimana, il gruppo di Gilboa riuscì a inserirlo, tra le LTR e il gene *neo*, in un derivato di N2 che venne chiamato SAX. Una volta completato venne inserito nella linea di cellule prodotte da Richard Mulligan.

Entro la fine del 1984 il vettore era completo e pronto per essere provato su animali.

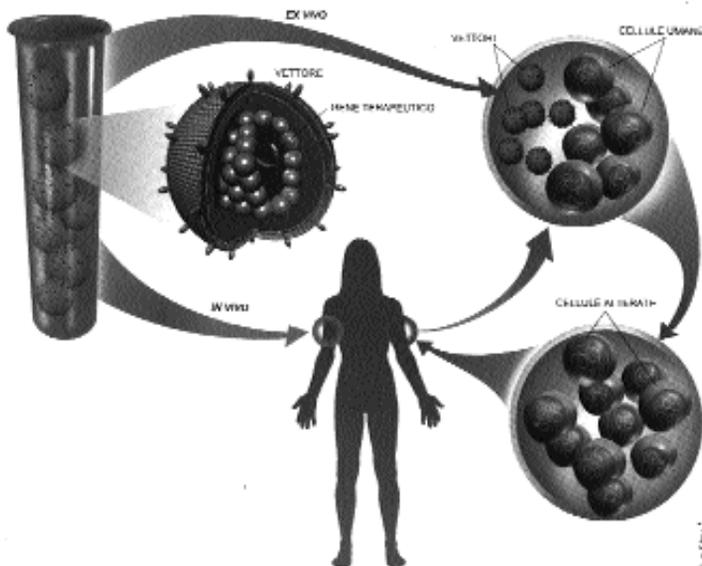
Così diventavano sempre più chiari i passi con cui «guarire» prima le cellule e poi i malati.

Nello stesso anno, in un articolo pubblicato su *Science*, Anderson scriveva: «Queste osservazioni fanno sperare di poter estrarre il midollo difettoso del malato, inserire in alcune sue cellule il normale gene ADA, quindi reimpiantare il midollo nell'organismo del paziente.»

Prospettava così i punti chiave del protocollo con cui, anche oggi, viene realizzata la tecnica *ex vivo*: prelevare dal paziente cellule malate, modificarle geneticamente *in vitro* usando i retrovirus vettori e infine reinserirle nel paziente.

E elencava i criteri per valutare i protocolli clinici delle future terapie geniche:

«BISOGNA DIMOSTRARE IN STUDI SU ANIMALI CHE IL NUOVO GENE PUÒ ESSERE INSERITO NELLE CELLULE BERSAGLIO E CHE IN ESSE PERMANE PER UN TEMPO SUFFICIENTE DA ESERCITARE I SUOI EFFETTI; CHE IL NUOVO GENE VIENE ESPRESSO DALLE CELLULE BERSAGLIO A LIVELLI APPROPRIATI; INFINE, CHE IL NUOVO GENE NON DANNEGGIA LA CELLULA E, PER ESTENSIONE, L'ANIMALE.»



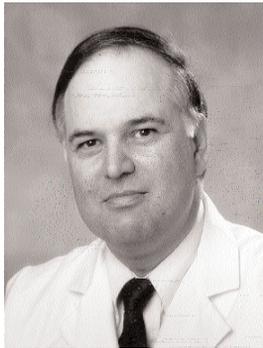
La terapia genica diventa realtà

Nel 1984, Anderson propose a Michael Blaese¹³ di collaborare per sviluppare una terapia genica per i bambini affetti da *deficit* di ADA. Insieme svilupparono una linea di cellule (linfociti T) sprovviste di ADA che mischiarono al vettore SAX contenente il gene ADA. Verificarono che il gene si trasferiva solo nel 20% delle cellule trattate, ma produceva livelli quasi normali di proteina.

I risultati, ottenuti entro l'estate 1985 e pubblicati un anno dopo su *Proceedings of the National Academy of Science*, dimostravano per la prima volta che, almeno *in vitro*, era possibile invertire il deficit di ADA mediante il trapianto di una copia normale del gene mutato.

Una sperimentazione sulle scimmie riuscì a dimostrare la produzione di proteina ADA da parte del midollo osseo di animali vivi (nel 1985-1986, al *Memorial Sloan-Kettering* di New York): cellule T prelevate dal sangue venivano coltivate in laboratorio, poi vi si inseriva il gene ADA e venivano reiniettate in circolo. In uno degli esperimenti si ottenne l'espressione del gene ADA per più di due anni, con un singolo trattamento.

Tra i ricercatori che lavoravano al *Memorial Sloan-Kettering* in quel periodo c'era Claudio Bordignon. Usando il vettore SAX sviluppato da Gilboa aveva dimostrato che era possibile trasferire efficientemente il gene dell'ADA nelle cellule del midollo osseo ottenute da un paziente affetto da carenza dell'enzima.¹⁴

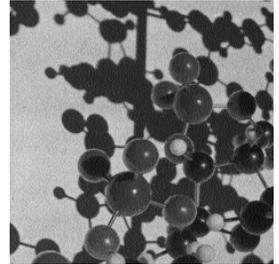


Michael Blaese

Nel 1987 Blaese intuì che l'integrazione dei geni attraverso i retrovirus era efficiente solo se avveniva in cellule che si riproducevano attivamente (come le cellule in coltura). Propose quindi di tentare la terapia genica sulle cellule T periferiche di bambini ammalati di SCID. In collaborazione con Kenneth Culver, dimostrò che si potevano manipolare geneticamente le cellule T periferiche di topo ottenendo la produzione di proteina ADA a livelli costanti e per periodi di tempo abbastanza lunghi.

Nel giugno 1988, la squadra di ricerca dei NIH, che nel frattempo aveva coinvolto nell'avventura un chirurgo del NCI (*National Cancer Institute*), Steven A. Rosenberg, che stava cercando di mettere a punto una nuova terapia per combattere il cancro, sottopose al RAC (*Comitato consultivo per il DNA ricombinante*) un protocollo per inserire il gene marcatore *neo* in linfociti TIL (*Tumour Infiltrating Lymphocytes*) di pazienti ammalati di tumore.

Solo nel dicembre 1988, dopo un ampio dibattito tra gli esperti, per la prima volta venne approvato il primo esperimento di trasferimento genico su esseri umani. Non era ancora una terapia, ma dimostrò che



¹³Michael Blaese, pediatra, ha lavorato ai NIH, al *National Cancer Institute*, a partire dal 1966. Dal 1994 è a capo della sezione di Terapia Genica del *National Center for Human Genome Research* (NHGRI) dei NIH.

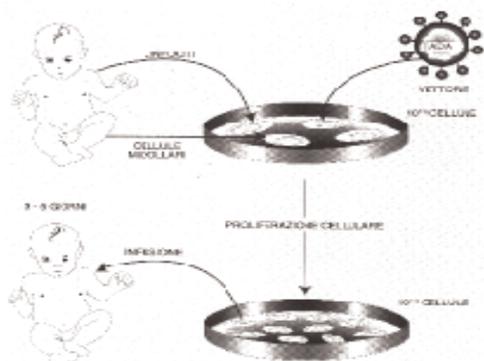
¹⁴I risultati di questo lavoro furono pubblicati nel 1989, quando Bordignon, insieme a Fulvio Mavilio formava il primo gruppo di ricerca all'*Istituto San Raffaele*.

era possibile marcare una cellula col gene *neo* per dimostrare la sua presenza nell'organismo, che il trasferimento genico mediante retrovirus nell'uomo era sicuro e i vettori non provocavano effetti collaterali.

Alla fine del 1989, Anderson e Blaese sottoposero al RAC un protocollo di trattamento del *deficit* di ADA con la terapia genica: esso prevedeva l'inserzione del gene nei linfociti del sangue periferico e la loro reinfusione nel paziente.

Nel contempo Bordignon, all'Istituto Scientifico H San Raffaele di Milano, stava sviluppando un modello originale per la terapia genica. Nel 1990 aveva trasferito il gene ADA nei linfociti di un bambino SCID con un nuovo vettore retrovirale¹⁶ e li aveva trapiantati in un topo SCID per vedere se erano in grado di funzionare *in vivo*. I risultati erano stati entusiasmanti: i linfociti trattati sopravvivevano e nel sangue dei topi erano presenti quantità misurabili di anticorpi umani e nella milza linfociti T capaci di rispondere a antigeni specifici. Questi esperimenti erano l'unica dimostrazione del beneficio derivante dal trasferimento genico per il sistema immunitario di un paziente carente di ADA e furono determinanti per l'approvazione del protocollo di Anderson.

Il 14 settembre 1990 venne effettuato il primo trapianto genico su un bambino affetto da SCID.



Il gruppo di Bordignon mise a punto un protocollo clinico diverso da quello americano: si introduceva il gene ADA sia nei linfociti del sangue sia in cellule del midollo osseo usando due vettori retrovirali quasi identici. Alla fine del 1990 il protocollo venne approvato dal Comitato Etico dell'ospedale San Raffaele e all'inizio del 1991 dal Comitato Nazionale per la Bioetica. Il 9 marzo 1992 venne effettuato su un bambino di nome Giuliano il terzo trapianto genico al mondo per correggere un *deficit* ereditario e il primo per cui venissero impiegate cellule di midollo osseo. Il 9 aprile la rivista *Nature* diede l'annuncio dell'intervento riconoscendo la novità assoluta dell'utilizzo del midollo osseo.

All'inizio del 1995, a oltre un anno dall'interruzione della terapia, i risultati testimoniavano che era veramente possibile trasferire informazione genetica nelle cellule progenitrici che alimentano il *turnover* cellulare del sangue circolante, aprendo così la strada alla terapia genica di molte altre malattie e non soltanto genetiche.» Il 20 ottobre 1995 *Science* pubblicava i risultati della sperimentazione clinica insieme al lavoro di Michael Blaese, di Ken Culver e French Anderson.

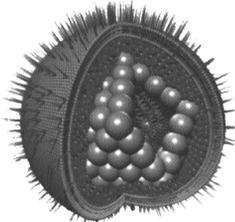
PER NOI FU UNA SODDISFAZIONE DIFFICILE DA ESPRIMERE, NON TANTO PERCHÉ AVEVAMO RAGGIUNTO E SUPERATO IL GRUPPO DI RICERCATORI CHE AVEVANO INIZIATO LA STORIA DELLA TERAPIA GENICA, MA PER LA CONSAPEVOLEZZA DI AVER FATTO UN BUON LAVORO, DI AVER POSTO LE DOMANDE GIUSTE E DI AVER RICEVUTO LE RISPOSTE ATTESE, GRAZIE AD UN APPROCCIO STUDIATO NEI MINIMI DETTAGLI PER OTTENERE QUELLE RISPOSTE.»¹⁷

Sviluppi e prospettive

Attualmente i geni vengono introdotti nei pazienti in due modi. Nella maggior parte dei casi si rimuovono alcune cellule da un tessuto del paziente, in laboratorio (*in vitro* o *ex vivo*) si introduce in esse il vettore di trasferimento e quindi si reimpiantano le cellule corrette *in vivo*. Altre volte i vettori sono inseriti direttamente nell'organismo (*in vivo*) nel tessuto che deve essere trattato. La procedura *ex vivo* è, in teoria, applicabile a tutte le malattie genetiche del sangue. Tuttavia, i linfociti hanno una vita limitata nel sangue, perciò occorre sviluppare tecniche che permettano di identificare, e trattare, le cellule staminali. Invece, per la procedura *in vivo*, è possibile agire solo su organi bersaglio facilmente raggiungibili e, preferibilmente, in cui le cellule si riproducano.

«QUESTA RIVOLUZIONE È LUNGI DALL'ESSERE NEL PIENO, COME VORREBBERO FAR CREDERE CERTI RICERCATORI IPERZELANTI, I RAPPRESENTANTI DI ALCUNE INDUSTRIE FARMACEUTICHE E TALVOLTA I MEZZI DI COMUNICAZIONE. SI LASCIA SPESSO INTENDERE CHE LA TERAPIA GENICA ABBA GIÀ RAGGIUNTO UN LIVELLO TALE DA POTER ESSERE APPLICATA SU LARGA SCALA, MA LA REALTÀ È BEN DIVERSA. LA PARTE CONCETTUALE DELLA RIVOLUZIONE DELLA TERAPIA GENICA È GIÀ STATA COMPIUTA; LA PARTE APPLICATIVA INVECE, CIOÈ LA CAPACITÀ TECNICA DI CURARE LE MALATTIE È TUTT'ALTRA FACCENDA. LA SFIDA PIÙ IMPORTANTE È RAPPRESENTATA DAI METODI PER INSERIRE I GENI NELLE CELLULE.»¹⁸

La ricerca è quindi, ancora una volta, rivolta allo sviluppo dei sistemi di trasferimento dei geni: essi devono essere sicuri, efficaci, capaci di funzionare in cellule che non si dividono e assicurare stabilità di espressione del gene terapeutico. Infatti, i vettori di geni attualmente usati, presenta vantaggi e svantaggi.

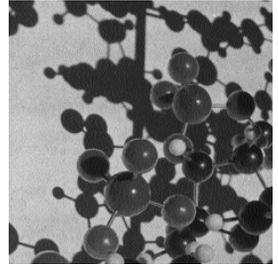


Virus dell'Herpes

Per esempio, molti retrovirus raggiungono i cromosomi solo durante la divisione cellulare, perciò possono essere utilizzati solo per cellule che si dividono attivamente.

I ricercatori del *National Human Genome Research Institute* (NHGRI), tra cui Richard Morgan, pensano che i vettori retrovirali possano trasferire una molecola (definita antisenso) nelle cellule T delle scimmie *Rhesus* aiutandole a combattere gli effetti del SIV, equivalente all'HIV.

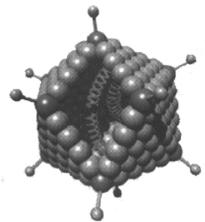
Gli adenovirus, che possono accogliere geni estranei di grandi dimensioni, non sempre assicurano l'integrazione del genoma nei cromosomi. Infatti, si sono rivelati poco efficienti nel trattamento della fibrosi cistica, ma sono stati recentemente usati, da Ronald Crystal a New York con una tecnica definita «*bio-bypass*», per promuovere la crescita di cellule endoteliali in pazienti sottoposti a interventi cardiocirurgici.



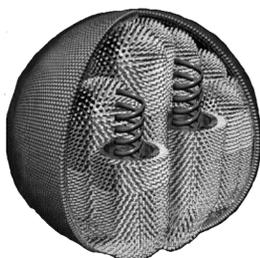
¹⁶Originariamente sviluppato nel laboratorio di Gilboa, permetteva di sfruttare alcune caratteristiche vantaggiose del «promotore» naturale del gene ADA.

¹⁷F. Mavilio, *Una storia italiana*, in: L. Thompson, op.cit., p.426.

¹⁸T. Friedmann, *Le scienze n.* 349, settembre 1997, p. 54.



Rappresentazione schematica di un adenovirus



I liposomi vengono preparati inserendo all'interno di batteri lipidi e plasmidi contenenti geni dalla possibile attività terapeutica.



Claudio Bordignon

I rischi legati a una possibile patogenicità virale hanno incoraggiato lo sviluppo di metodi non virali per il trasferimento genico. Per esempio, i liposomi (o lipoplessi) non hanno geni virali e non causano malattie, sono abbastanza semplici da produrre, ma si sono dimostrati efficaci solo in vitro, su cellule in coltura.

Alcuni gruppi stanno anche cercando di inoculare in pazienti il cosiddetto DNA nudo. I risultati iniziali indicano che questa strategia ha interessanti potenzialità per l'immunizzazione contro le malattie infettive, nonché nei confronti di alcuni tipi di cancro, ma i dati sono ancora controversi.

«IN FUTURO SI SCEGLIERÀ DI VOLTA IN VOLTA IL PIÙ ADEGUATO TRA I METODI DI TRASFERIMENTO GENICO DISPONIBILI. [...] LE SFIDE TUTTAVIA NON TERMINERANNO CON IL PERFEZIONAMENTO DEI VETTORI: LE CELLULE INFATTI SPESSO MODIFICANO I GENI ESTRANEI IN MISURA TALE DA RENDERLI NON FUNZIONALI. QUESTO PROBLEMA, PUR STUDIATO A FONDO, NON È ANCORA STATO RISOLTO.»

La possibilità di introdurre geni nuovi nelle cellule ha aperto nuove prospettive, soprattutto potenziando o sopprimendo la risposta immunitaria cellulare rispetto a un bersaglio specifico.

Per quanto riguarda l'immunizzazione intracellulare si sta cercando di inserire nelle cellule un gene di resistenza in grado di inibire la replicazione virale, intervento che potrebbe essere utile per la terapia dell'AIDS; infine si sta tentando la strada dell'immunoterapia antitumorale trasferendo in cellule del sistema immunitario molecole che inducano una risposta contro il tumore.

In questa direzione si stanno sviluppando, su diverse strade, terapie nuove nella lotta contro il cancro. Molte prospettive sono ancora una promessa e non una realtà: saranno necessari attenti studi preclinici per arrivare in tempi brevi a reali applicazioni cliniche.

Per esempio, all'Università di Torino, Robert Foa ha dimostrato che i geni dell'interleuchina 2 (IL2), introdotti nelle cellule tumorali, ne attivano la risposta immunitaria.

In America, Michael Blaese e Ken Culver stanno studiando la strategia del cosiddetto «gene suicida»: hanno dimostrato che, introducendo nelle cellule di tumori cerebrali il gene TK, queste diventano sensibili a agenti terapeutici come il ganciclovir.

Anche Bordignon, nell'ambito dell'*Istituto Telethon* per la terapia genica delle malattie ereditarie del S. Raffaele (TIGET) sta sviluppando la strategia del gene suicida per prevenire i danni derivanti dalle reazioni dell'organismo ai trapianti di midollo osseo utilizzati nella cura delle leucemie e di certi linfomi. La terapia prevede l'introduzione di un gene TK nelle cellule del midollo osseo del donatore. In caso si manifestasse nel paziente intolleranza grave, viene somministrato al paziente il ganciclovir che

le
v

uccide

selettivamente.

NON SOLO FORMULE

