

## MeB – Pagine Elettroniche

Volume IV

Marzo 2001

numero 3

## APPUNTI DI TERAPIA

## Vettori virali per il trasferimento di geni

G. Bartolozzi

Indirizzo per corrispondenza: bartolozzi@unifi.it

La scoperta dell'origine genetica di molte malattie dell'uomo ha creato le basi culturali per la terapia genica. Le alterazioni dei geni che sono alla base di queste malattie possono essere diverse:

- delezione, il gene cioè può mancare completamente
- mutazione puntiforme: sostituzione di un nucleotide con un altro nello stesso gene, per cui viene sintetizzato un aminoacido diverso, in un punto essenziale per il funzionamento della proteina. Di conseguenza l'enzima (se la proteina codificata è un enzima) può avere una funzione residua più o meno importante o può non fornire alcuna attività.
- traslocazione: dovuta a crossing over ineguale, con migrazione di nucleotidi da un gene all'altro
- perdita di un allele
- altro

E' stata tentata la sostituzione del gene patologico con un gene funzionante per una completa restitutio ad integrum della funzione (terapia genica). Si sono quindi succeduti studi per la terapia genica della deficienza di adenosin deaminasi (ADA), della fibrosi cistica, della deficienza di recettori delle lipoproteine a bassa densità, dell'emofilia A e B, della deficienza di alfa-1-antitripsina e della malattia di Guacher (Walther W, Stein U, *Drugs* 60, 249-71, 2000).

Per il trasferimento dei rispettivi geni alla cellula bersaglio o al tessuto sono stati usati, come vettori, alcuni virus, approfittando della loro grande capacità di trasportare le informazioni, inserite nel loro genoma, geneticamente modificato. La scelta dei virus più adatti al trasferimento dei geni è stata difficile e molto complessa, perché dovevano essere ridotti al minimo i potenziali effetti patogeni dei virus, l'immunogenicità e il rischio potenziale di ricombinazioni omologhe e di tossicità.

Numerosi vettori virali sono stati studiati *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, ricavati soprattutto da virus del topo e di virus a RNA e a DNA dell'uomo. I vettori più comunemente usati sono stati ricavati dai:

- retrovirus
- lentivirus
- adenovirus
- herpes simplex virus
- adenovirus.

Di recente sono stati studiati sotto questo punto di vista altri vettori virali, quali il virus del vaiolo, il citomegalovirus, il virus di Epstein Barr e altri.

Fra tutti questi, i vettori retrovirali hanno rappresentato il sistema più importante, poiché essi hanno un'alta efficienza nel trasferimento di geni e mediano alte espressioni di geni terapeutici. Ma anche adenovirus o herpes virus hanno caratteristiche tali da essere utilizzati per il trasferimento di geni.

Con i retrovirus sono stati compiuti oltre 150 studi, nei quali sono stati coinvolti 1-500 pazienti. Sebbene la terapia genica con retrovirus sia stata impiegata essenzialmente nel trattamento dei tumori maligni, sono state studiate anche numerose malattie ereditarie. In particolare i vettori retrovirali sono stati usati per la terapia genica della deficienza di adenosin deaminasi (ADA). Questa malattia, come si sa, determina una grave immuno-deficienza combinata (SCID). La funzione delle cellule T è stata parzialmente restituita dal trasferimento *ex vivo* del gene ADA e dalla reintroduzione di queste cellule nel paziente. Questa metodica si è dimostrata utile e le cellule T di questi pazienti hanno guadagnato una normale funzione immune. Più recentemente sono state usate cellule del cordone ombelicale per il trasferimento del gene ADA: dopo due anni dal trapianto furono ancora dimostrabili cellule ADA-positive. Tuttavia al momento attuale non è stato ancora visto un significativo miglioramento nella funzione immune di questi pazienti.

Tabella - Aspetti dei sistemi vettori virali per la loro applicazione nella terapia genica

Vettore

|                   |                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                             |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Retrovirus</b> | Capacità d'inserimento del gene, integrazione stabile nel DNA dell'ospite, elevati titoli di virus ricombinante, ampio tropismo d'infezione, relativa facilità di manipolazione del genoma virale | Difficoltà nel controllare l'infezione virale, mancata infezione delle cellule non in divisione, integrazione a caso nel genoma dell'ospite |
| <b>Lentivirus</b> | Infezione delle cellule in divisione o meno, espressione stabile del gene, elevata capacità d'inserimento                                                                                         | Mutagenesi potenziale presenza di sequenze proteiche regolatrici e accessorie                                                               |

|                              |                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                       |
|------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Adenovirus</b>            | Elevati titoli di virus, alta espressione genica, grande capacità d'inserimento, infezione di cellule in divisione e non in divisione                                | Risposte immuni alle proteine virali, nessuna integrazione nel genoma dell'ospite, espressione genica transitoria                                                     |
| <b>Virus adeno-associati</b> | Infettano le cellule in divisione o meno, ampio tropismo cellulare, potenziale d'integrazione, bassa immunogenicità e non patogenicità                               | Limitate capacità per i transgeni, difficile generazione di alti titoli virali, presenza di adenovirus o herpesvirus per la moltiplicazione dei virus adeno-associati |
| <b>Herpesvirus</b>           | Infettano un'ampia varietà di tipi cellulari, alta capacità d'inserzione, tropismo naturale per le cellule neuronali, seguita dalla produzione di alti titoli virali | Possibile tossicità, rischio di ricombinazione, nessuna integrazione virale nel DNA dell'ospite                                                                       |
| <b>Poxvirus</b>              | Alta capacità d'inserzione, possibile inserzione di grandi frammenti di DNA, alti livelli di espressione transgenica, seguita da virus vivo ricombinante             | Possibile effetto citopatico                                                                                                                                          |
| <b>Virus</b>                 |                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                       |

di Epstein-Barr

Infetta cellule in divisione o meno con prevalenza per i linfociti B, alta capacità d'inserimento

Difficoltà di controllare le linee cellulari

Poiché i vettori adenovirus sono molto efficienti nel trasferimento di geni, essi sono stati spesso usati negli studi clinici di terapia genica. Il primo uso clinico che ha impiegato gli adenovirus come vettori è stato quello riguardante il trattamento della Fibrosi cistica, una malattia gravissima, dovuta ad alterazione del trasporto di cloro attraverso la membrana cellulare. Poiché si sapeva che gli adenovirus hanno un particolare tropismo per il tessuto epiteliale, si è pensato che questi virus rappresentassero il sistema di scelta per il trasferimento del gene della *CFTR*. A tale scopo il gene *CFTR* venne trasferito all'epitelio nasale, usando i vettori Ad2 e Ad5, che hanno portato a una transitoria ricostruzione del trasporto di cloruri nella sede di applicazione.

Queste prove cliniche hanno indicato che l'applicazione topica del vettore adenovirus all'epitelio nasale comporta solo un trasferimento di geni di bassa attività con pochi effetti correttivi a livello molecolare e funzionale.

In un altro studio clinico l'epitelio nasale e bronchiale venne in contatto per via aerosolica con il vettore adenovirale, portando a una transitoria espressione del gene *CFTR* in questi tessuti.

Hanno seguito almeno altri 10 studi in USA e in Europa, che hanno portato alla conclusione che l'espressione del gene è solo transitoria e di poca efficacia clinica. Fra le ragioni dell'insuccesso sono state annoverate diverse possibilità:

- la barriera mucosa delle cellule bersaglio
- il relativamente rapido turnover delle cellule delle vie aeree
- la risposta immune alle cellule infettate
- altre possibilità

Per il grande interesse nel mondo per la terapia genica, numerosi sono ancor oggi gli sforzi per raggiungere un ottimale trasferimento dei geni in vivo. Per i loro innumerevoli vantaggi

i vettori virali sono ancora al centro dei programmi mondiali di ricerca.

Numerosi miglioramenti sono stati fatti nel trasferimento dei geni nell'uomo. Le esperienze di base e gli studi clinici in fase I e II indicano che specifiche malattie richiedono particolari sistemi di vettori virali. I vettori virali hanno dimostrato di essere sicuri e ben tollerati. Tuttavia, almeno per ora, la maggioranza delle prove cliniche che usano i vettori virali per la terapia genica nell'uomo manca di significativi successi clinici.