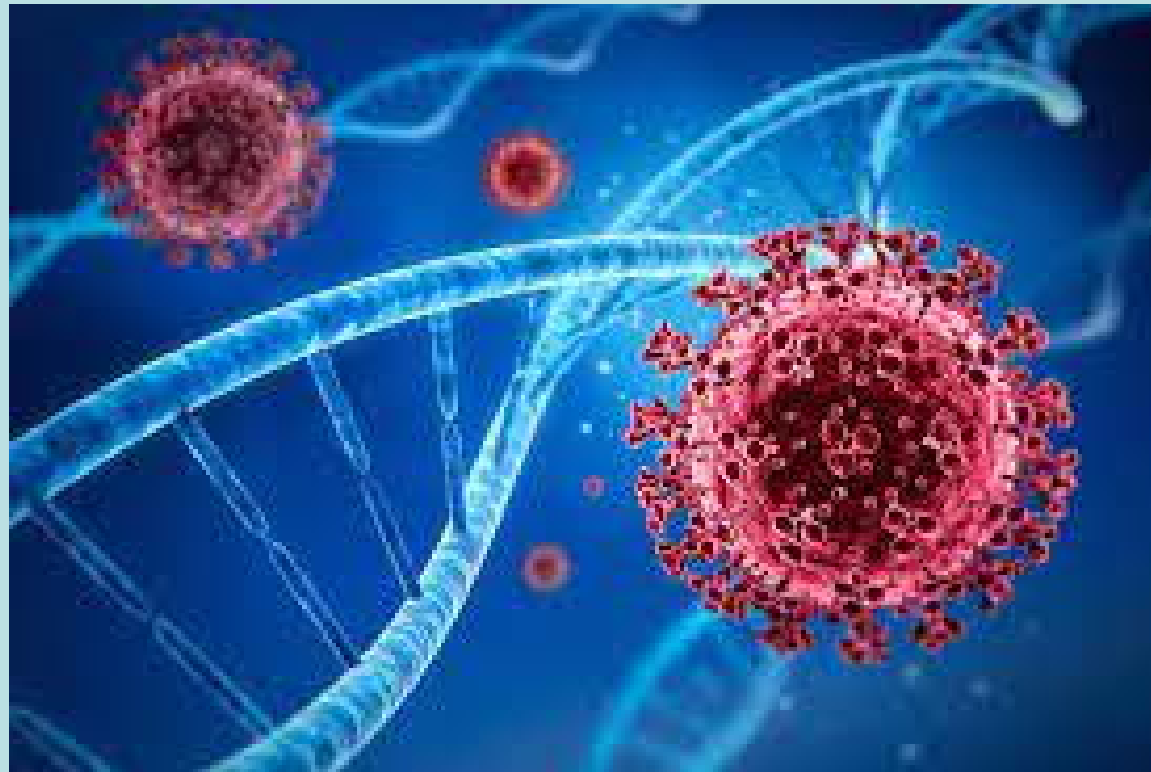


Genetica 4

Cosa c'è di nuovo in genetica?

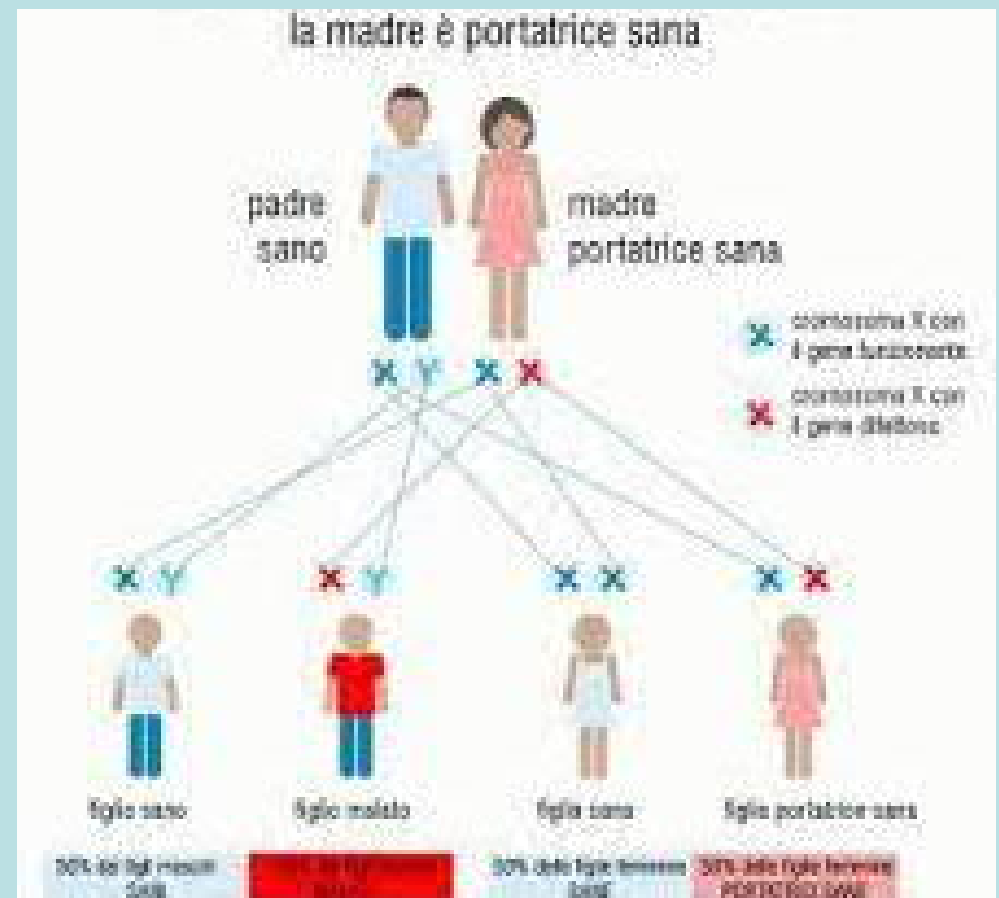
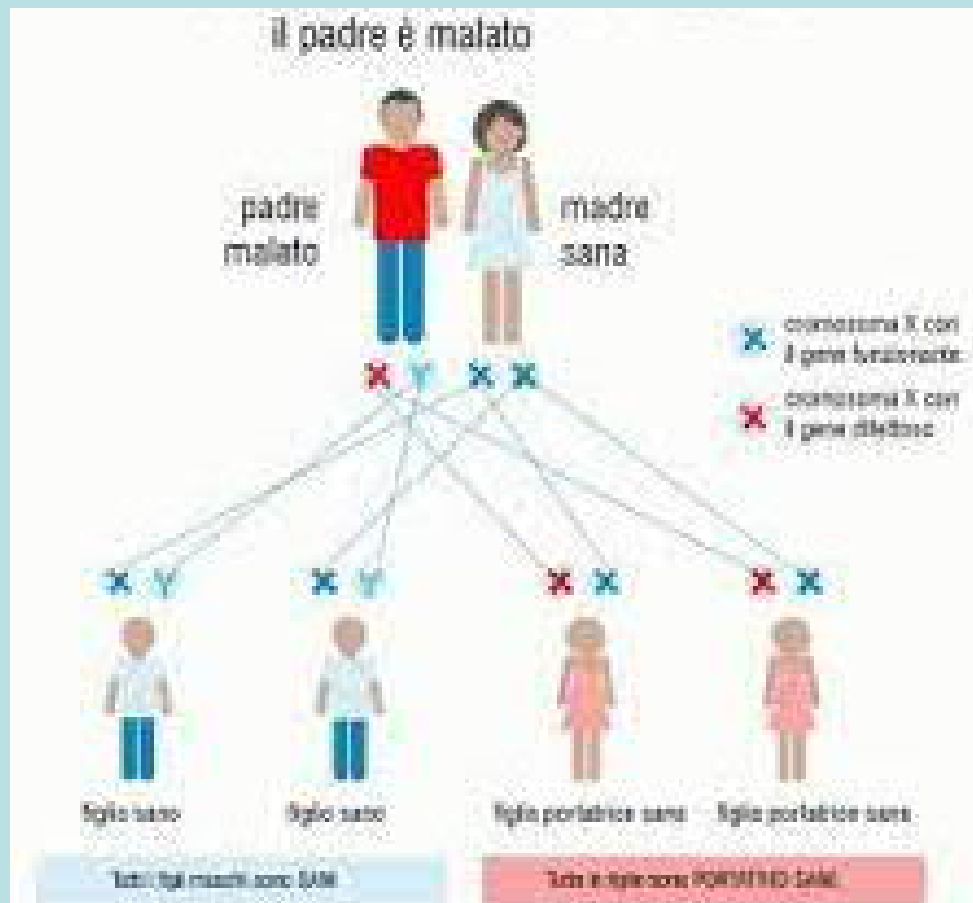


Rita Dougan 2023

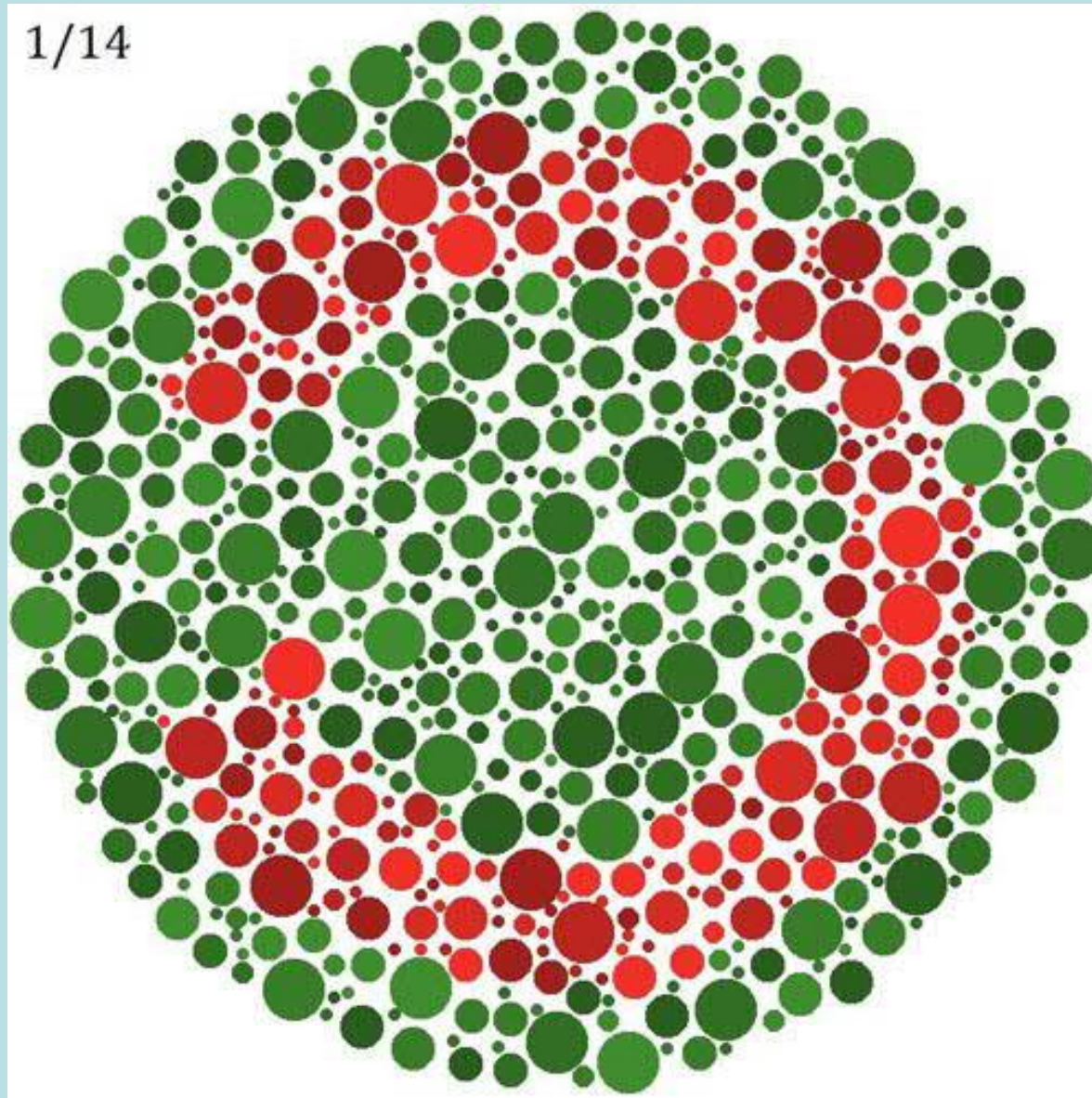
Malattie ereditarie portate dal cromosoma X

- Daltonismo
- Emofilia
- Distrofia muscolare di Duchenne
- Sindrome dell'X fragile

Ereditarietà portata dal cromosoma X



Daltonismo



Le emofilie

Le **emofilie** sono patologie della **coagulazione del sangue** con ereditarietà recessiva legata al cromosoma X:

- derivano da mutazioni, delezioni o inversioni a carico dei geni che codificano per il fattore della coagulazione VIII o per il fattore IX.
- l'entità del deficit del fattore determina la probabilità e la gravità del sanguinamento.

Conseguenze dell'emofilia

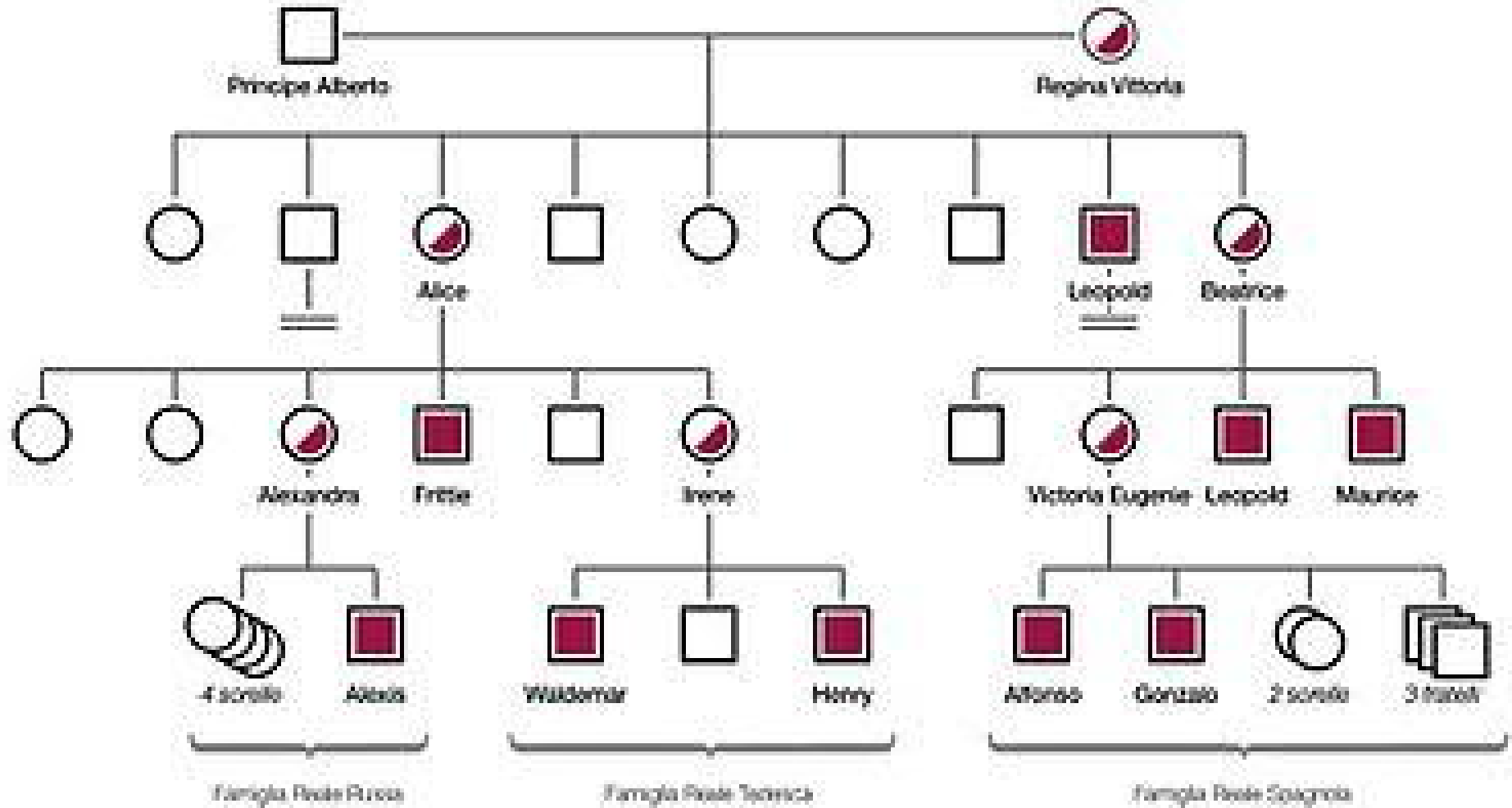
Dopo un trauma, in genere si sviluppa un sanguinamento nei tessuti profondi o nelle articolazioni entro poche ore. Il sanguinamento può essere immediato o verificarsi lentamente, a seconda dell'entità del trauma e dei livelli plasmatici di fattore VIII o IX.

Emartri cronici o ricorrenti possono portare a sinovite e artropatia.

Anche un banale trauma al capo può causare emorragia endocranica.

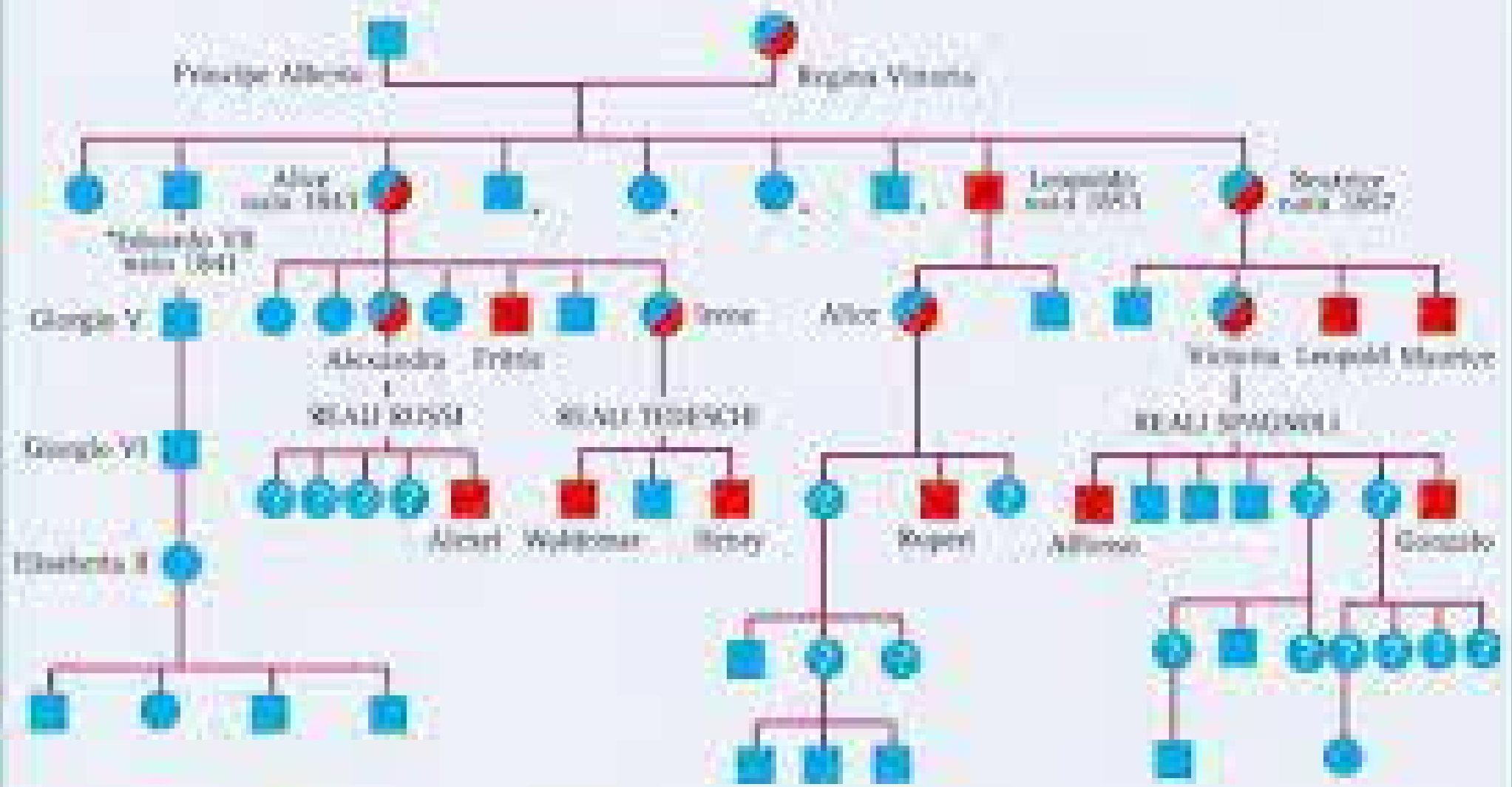
Un sanguinamento alla base della lingua può causare una compressione delle vie aeree, potenzialmente fatale

Albero Genealogico della discendenza della Regina Vittoria



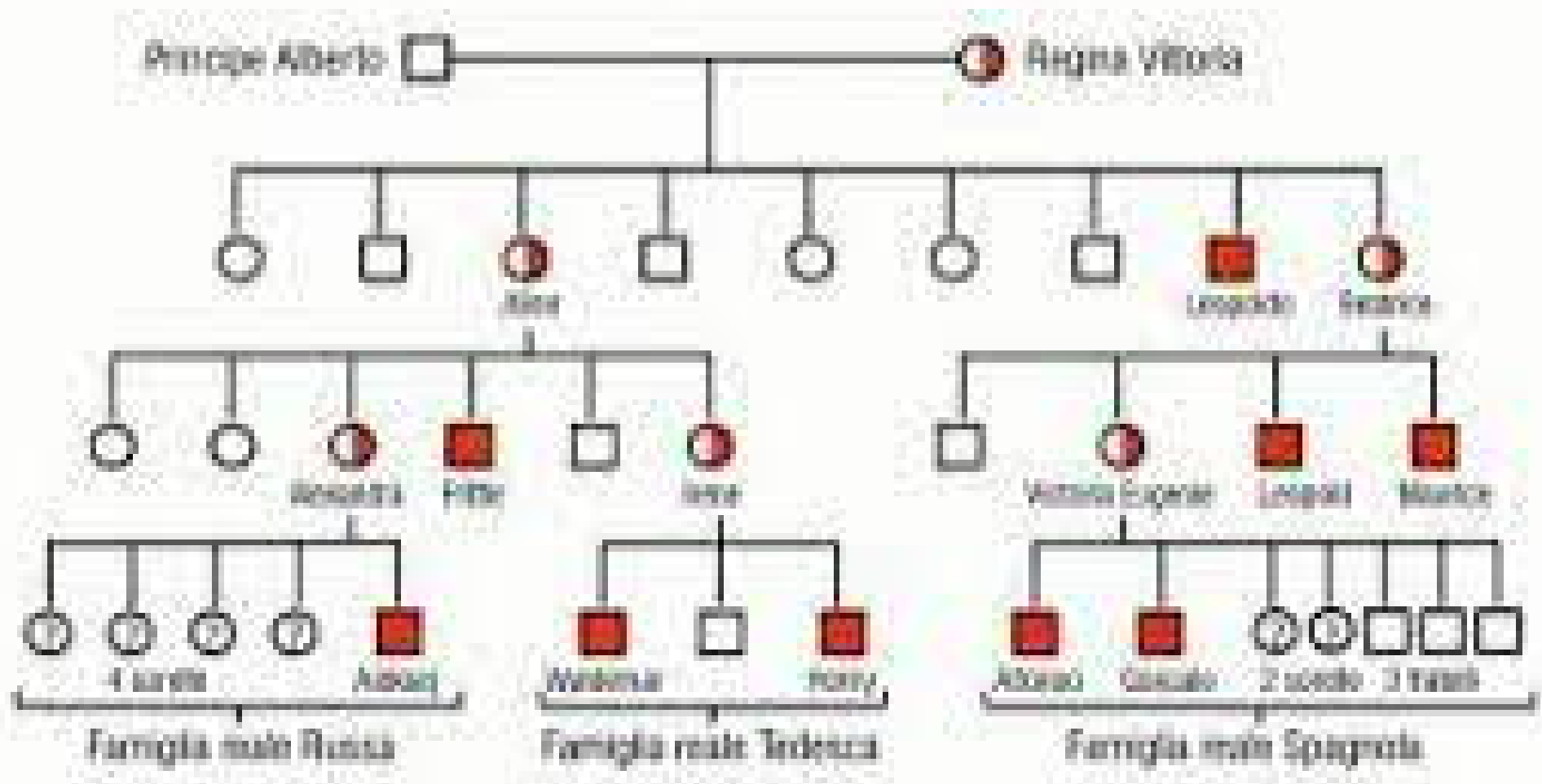
Maschio sano
 Maschio affetto da emofilia
 Femmina sana
 Femmina portatrice sana di emofilia

Albero genealogico della Regina Vittoria



■ Maschio sano
 ■ Maschio malato
 ● Femmina normale
 ● Femmina portatrice * Discendenti nati

Albero genealogico della Regina Vittoria



□ Maschio sano
 ■ Maschio malato

○ Femmina sana
 ● Femmina portatrice sana

† sconosciuto

La coagulazione

La **coagulazione** è un processo che mira a limitare la perdita di sangue (emorragia) che si verifica in seguito a una lesione di un vaso.

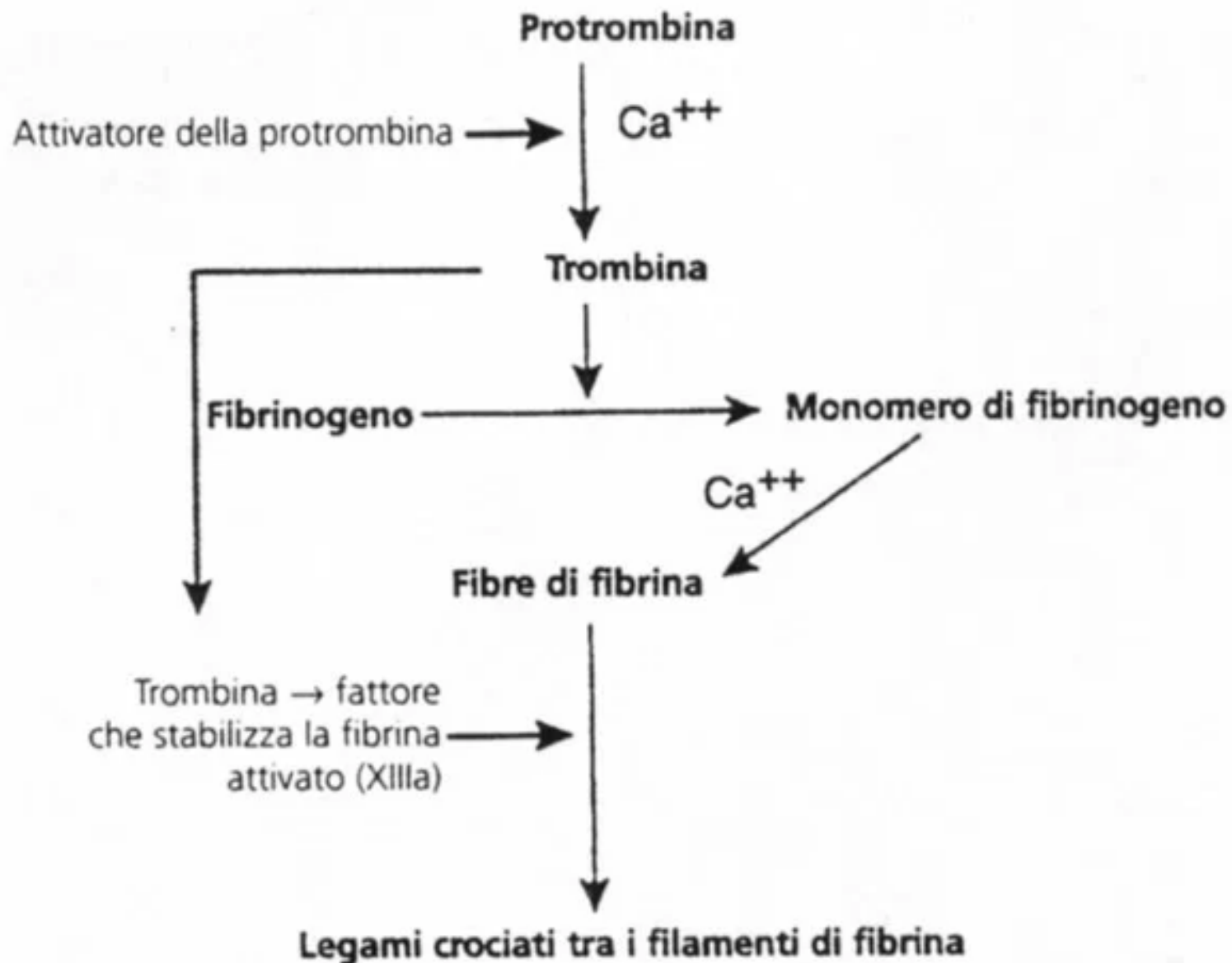
La prima fase consiste nell'attivazione delle piastrine: la lesione dell'endotelio del vaso attiva le piastrine le quali aderiscono alla parete lesa e si aggregano, ossia si riuniscono insieme a formare un ammasso (tappo piastrinico o trombo bianco), dal quale vengono liberate delle sostanze che attivano un gruppo di proteine del sangue costituenti i “**fattori della coagulazione**” (numerati da I a XIII).

La coagulazione

I **fattori della coagulazione** hanno la caratteristica di attivarsi a catena uno dopo l'altro a cascata, nel senso che ogni fattore attiva un numero maggiore di proteine del fattore successivo;

l'ultima tappa di questa attivazione comporta la trasformazione del **fibrinogeno** in **fibrina insolubile**, che precipita costituendo sottili filamenti che si intersecano e formano una stretta rete, nella quale restano imprigionati gli elementi figurati del sangue (trombo rosso); si ottiene così l'arresto dell'emorragia.

I fattori della coagulazione sono proteine plasmatiche che vengono prodotte nel fegato; alcuni di questi fattori possono essere prodotti solo in presenza di **vitamina K**, la cui carenza provoca una maggiore propensione alle emorragie, pertanto viene chiamata antiemorragica



Schema della conversione della protrombina in trombina e polimerizzazione del fibrinogeno in filamenti di fibrina.

Vie della coagulazione

La coagulazione può iniziare per via estrinseca e per via intrinseca proseguendo poi in una via comune.

La via estrinseca è più rapida per il minor numero di fattori che vi prendono parte. Essa viene attivata quando una lesione di un vaso sanguigno produce la liberazione, dalle cellule danneggiate, di fosfolipidi e di un complesso proteico detto fattore tissutale o tromboplastina tissutale.

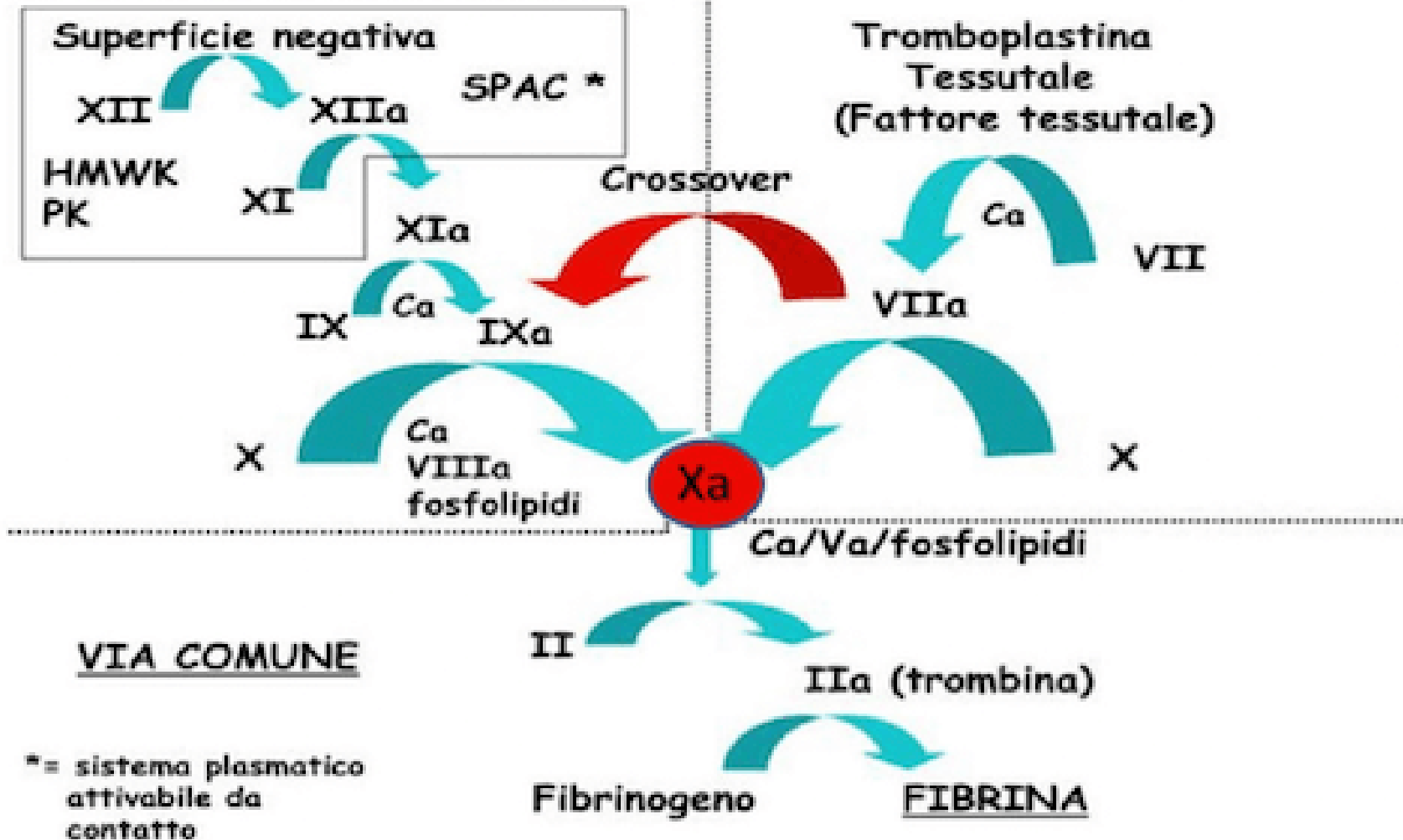
La via intrinseca è più lenta si verifica quando il sangue entra a contatto con la matrice extracellulare, in particolare con le macromolecole di collagene.

Una lesione tissutale attiva entrambe le vie della coagulazione

La coagulazione per sola via intrinseca può verificarsi in condizioni patologiche, all'interno di vasi la cui superficie endoteliale sia danneggiata.

VIA INTRINSECA

VIA ESTRINSECA



Le emofilie

L'**emofilia A** (circa l'80% dei pazienti) comporta carenza del **fattore VIII**, è una glicoproteina

L'**emofilia B** comporta carenza di **fattore IX**.

- Poiché questi geni sono localizzati sul cromosoma X, l'emofilia colpisce quasi esclusivamente i maschi.
- Le **figlie** di maschi affetti da emofilia sono **portatrici** obbligate, mentre i **figli** sono **normali**.
- Ciascun figlio maschio di una portatrice ha una probabilità del 50% di avere l'emofilia
- Ciascuna figlia femmina ha una probabilità del 50% di essere portatrice.

Trattamento tradizionale

La sostituzione del fattore carente costituisce il trattamento primario:

- I fattori VIII e IX possono essere somministrati sotto forma di concentrati purificati, che sono ricavati da donatori multipli.
- Tali prodotti detti emoderivati, vengono sottoposti a inattivazione virale, ma l'inattivazione non è in grado di eliminare i parvovirus o il virus dell'epatite .

Trattamento con fattori ricombinanti

Si somministrano i fattori VIII e IX prodotti con la “tecnologia del DNA ricombinante”:

- sono proteine prodotte da cellule in cui è stato introdotto un gene (un tratto di DNA) che rende le cellule capaci di produrre i singoli fattori.
- i fattori ricombinanti sono privi di virus e in genere sono preferibile.

Nuove cure: terapia genica

L'idea di fondo è semplice: dal momento che le malattie genetiche sono causate da un difetto in un determinato gene, inserendo dall'esterno una copia funzionante è possibile ristabilire la corretta funzione di quel gene



Terapia genica

Esistono due principali modalità di somministrazione per la terapia genica:

- **ex vivo**: la correzione avviene all'esterno dell'organismo del paziente. Le cellule bersaglio vengono prelevate dal paziente, modificate geneticamente e reintrodotte nel paziente stesso.
- **in vivo**: il “gene terapeutico” viene somministrato direttamente nell'organismo del paziente, mediante un'iniezione per via locale (organo bersaglio) o per via sistemica (nella circolazione sanguigna);
- Per veicolare il “gene terapeutico” all'interno delle cellule o dell'organismo si utilizzano generalmente dei vettori virali: ad oggi i più utilizzati sono i vettori virali adeno-associati (AAV).

Terapia genica per emofilia A

7 Settembre 2022:

Approvazione di **valoctocogene roxaparvovec**
nome commerciale **Roctavian** in Europa, prodotta
dall'azienda BioMarin Pharmaceutical

Valoctocogene roxaparvovec viene somministrata con
infusione endovenosa un'unica volta (si tratta di una
terapia genica in vivo "one shot") e agisce fornendo al
paziente un gene grazie a cui le cellule del suo
organismo possono iniziare a produrre il **fattore VIII**
senza che sia più necessario ricorrere alle infusioni
periodiche“

Terapia genica per emofilia B

22 novembre 2022:

La Food and Drug Administration dà il via libera a
etranacogene dezaparvovec

La terapia genica etranacogene dezaparvovec, nome commerciale **Hemgenix®**, è stata sviluppata dalla biotech olandese UniQure che ha poi passato la staffetta a CSL Behring, l'azienda ha completato gli studi e ottenuto la commercializzazione.

Per ora interessa solo il mercato statunitense, ma se ne parla già anche in Europa, visto che la richiesta di Autorizzazione all'Immissione in Commercio è già stata fatta all'Agenzia Europea dei Farmaci (EMA).

Terapia genica per emofilia B

Etranacogene dezaparvovec è indicata per il trattamento di pazienti adulti affetti da emofilia B, attualmente sottoposti a terapia profilattica con somministrazione del Fattore IX , o soggetti a sanguinamenti gravi o a episodi ripetuti di sanguinamento spontaneo.











Si tratta di una terapia genica che sfrutta un vettore adeno-virale (AAV5) per trasportare all'interno delle cellule bersaglio la copia corretta del gene che codifica per il fattore IX, in modo tale da produrne una quantità 5-8 volte maggiore del normale.


Etranacogene dezaparvovec è una terapia **“one shot”** che viene somministrata con una singola infusione endovenosa ed è così in grado di ridurre il tasso di sanguinamento anomalo consentendo all'organismo di produrre con continuità il fattore IX.

LE TERAPIE AVANZATE IN EUROPA E IN ITALIA



TERAPIA GENICA

NOME COMMERCIALE	INN*	INDICAZIONE	SOMMINISTRAZIONE E VETTORE	AZIENDA	APPROVAZIONE EUROPEA	AIC* IN EUROPA	AIC* IN ITALIA
Glybera®	alipogene tiparvovec	deficit familiare di lipasi lipoproteica con gravi o ripetuti attacchi di pancreatite	in vivo virus adeno-associato	uniQure biopharma	ottobre 2012 farmaco orfano	 da ottobre 2017	 da ottobre 2017
Imlygic®	talimogene laherparepvec	melanoma inoperabile con metastasi regionali o a distanza (Stadio IIIB, IIIC e IVM1a)	in vivo virus herpes simplex	Amgen Europe	dicembre 2015		 Classe C(III)* richiesta di rimborso non sottomessa
 Stimvelis®	frazione cellulare arricchita di cellule autologhe CD34+ contenente cellule CD34+ geneticamente modificate contenente la sequenza di cDNA che codifica per l'ADA umana	ADA-SCID nei casi di assenza di donatore consanguineo	ex vivo retrovirus	Orchard Therapeutics	maggio 2016 farmaco orfano		 Classe H* luglio 2016
Luxturna™	voretigene neparvovec	distrofia retinica ereditaria	in vivo virus adeno-associato	Novartis Europharm Limited	novembre 2018 farmaco orfano		 Classe H* dicembre 2020
Zynteglo®	betibeglogene autotemcel	beta talassemia trasfusione dipendente senza genotipo β^0/β^0 (sopra ai 12 anni)	ex vivo lentivirus	bluebird bio	maggio 2019 farmaco orfano	 da marzo 2022	

NOME COMMERCIALE	INN*	INDICAZIONE	SOMMINISTRAZIONE E VETTORE	AZIENDA	APPROVAZIONE EUROPEA	AIC* IN EUROPA	AIC* IN ITALIA
Zolgensma®	onasemnogene abeparvovec	atrofia muscolare spinale (SMA) di tipo 1; oppure di pazienti con SMA che hanno fino a tre copie del gene SMN2	in vivo virus adeno-associato	Novartis Gene Therapies EU Limited	maggio 2020 farmaco orfano	✓	✓  Classe H* marzo 2021
 Libmeldy™	cellule autologhe CD34+ che codificano il gene ARSA	leucodistrofia metacromatica	ex vivo lentivirus	Orchard Therapeutics	dicembre 2020 farmaco orfano	✓	✓  Classe H* marzo 2022
Skysona™	elivaldogene autotemcel (Lenti-D™)	adrenoleucodistrofia cerebrale precoce con una mutazione nel gene ABCD1	ex vivo lentivirus	bluebird bio	luglio 2021	✗ da novembre 2021	✗
Upstaza™	eladocagene exuparvovec	deficit della decarbossilasi degli L aminoacidi aromatici	in vivo virus adeno-associato	PTC Therapeutics	luglio 2022 farmaco orfano	✓	✗
Roctavian™	valoctocogene roxaparvovec	emofilia A grave (carenza congenita di Fattore VIII)	in vivo virus adeno-associato	BioMarin International Limited	agosto 2022 farmaco orfano	✓	✗

I farmaci detti 'orfani'

I **farmaci** detti '**orfani**' sono destinati alla cura delle malattie talmente rare da non consentire la realizzazione, da parte delle aziende farmaceutiche, di ricavi che permettano di recuperare i costi sostenuti per il loro sviluppo. Sono comunque farmaci che rispondono a un bisogno di salute pubblica

Il processo che va dalla scoperta di una nuova molecola alla sua commercializzazione è lungo (in media 10 anni), costoso (diverse decine di milioni di euro) e molto aleatorio (tra dieci molecole testate, una sola può avere effetto terapeutico).

Farmaci detti 'orfani'

- Sono concepiti per il trattamento dei pazienti affetti da malattie molto gravi, per le quali non esiste ancora una cura soddisfacente.
- Queste malattie colpiscono una parte limitata della popolazione (meno di una persona su 2000 in Europa), molto spesso dalla nascita o nell'infanzia.
- Ad oggi, nel mondo, il numero di malattie rare per le quali non esiste una cura è stimato tra 4000 e 5000 circa; e da 25 a 30 milioni sarebbero le persone interessate da queste malattie in Europa

Sviluppo di nuovi farmaci

Le università, gli istituti accademici e i centri di ricerca possono arrivare a finanziare trial clinici di Fase I ma non sono in grado di andare oltre perchè sono necessari milioni di euro per approdare in Fase II.

È a questo punto che intervengono le piccole aziende biofarmaceutiche o le multinazionali del farmaco, consentendo di arrivare a una sperimentazione di Fase III e a una successiva (eventuale) approvazione del farmaco il quale può giungere così sul mercato.

Una soluzione che si prospetta a livello europeo è il Consorzio AGORA (Access to Gene therapies fOr RAre disease) che serve a creare una coscienza in merito alla necessità di non abbandonare i pazienti al proprio destino solo perché le terapie avanzate che potrebbero curarli costano troppo

Editing genetico

2012 **Editing genetico**

E' la riscrittura del DNA con la
tecnica Crispr-Cas9

che permette

sia di distruggere un gene responsabile di malattia,

sia di sostituire un gene malato con un gene sano

si propone per la cura non solo di malattie genetiche, ma
anche di tumori.

Editing classico

2012

Cas9: Jennifer Doudna ed Emmanuelle Charpentier

- usa una molecola di RNA per guidare Cas9 verso la sequenza genomica da modificare
- recide entrambe le eliche del DNA
- consente ai ricercatori di inattivare il gene preso di mira sfruttando i meccanismi di riparazione del DNA

CRISPR - Cas9

CRISPR associated protein 9

Clustered **R**egularly **I**nterspaces **S**hort
Palindromic **R**epeats
Cas9 (enzima)

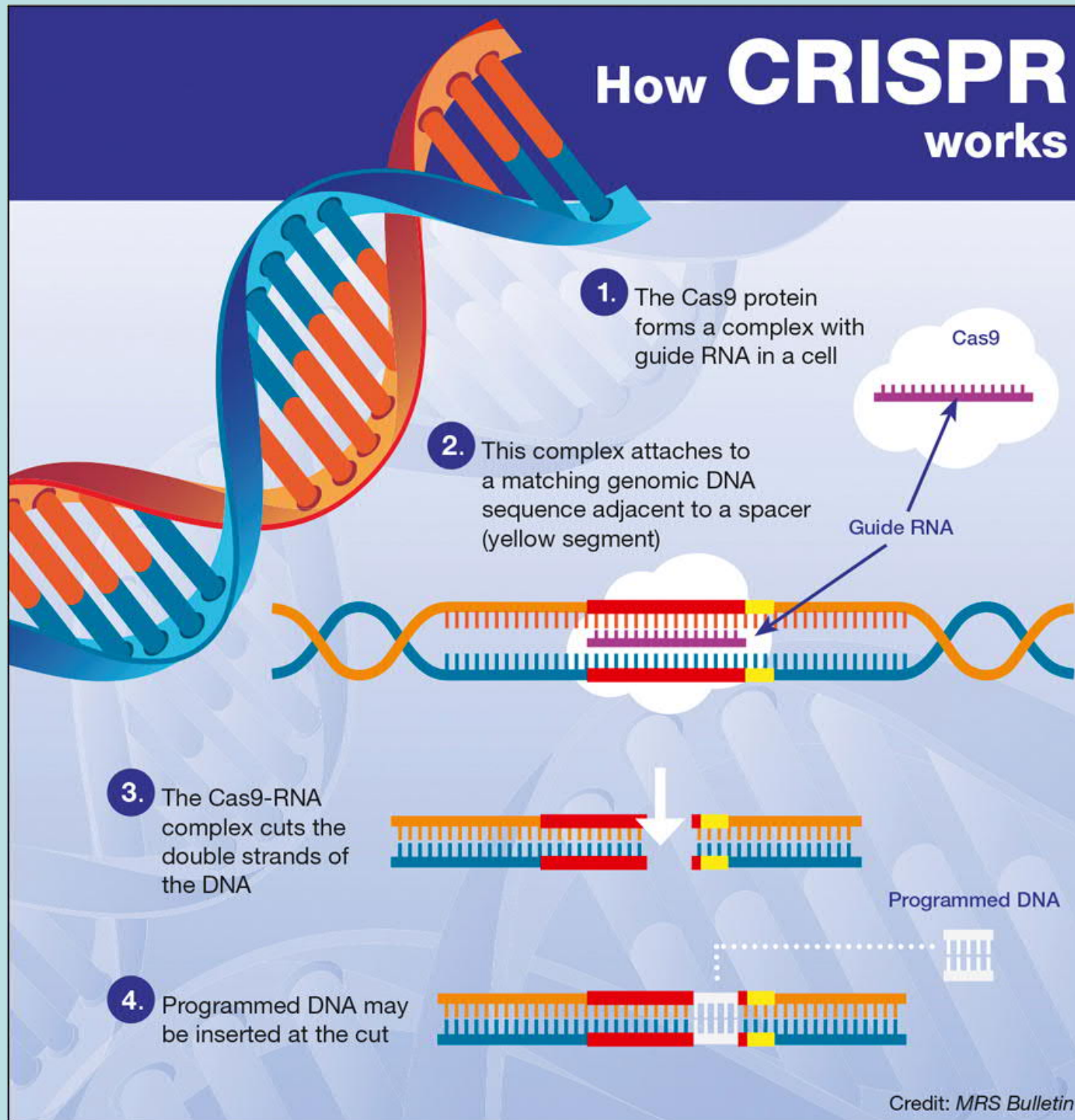
Evoluzione dell'editing genetico

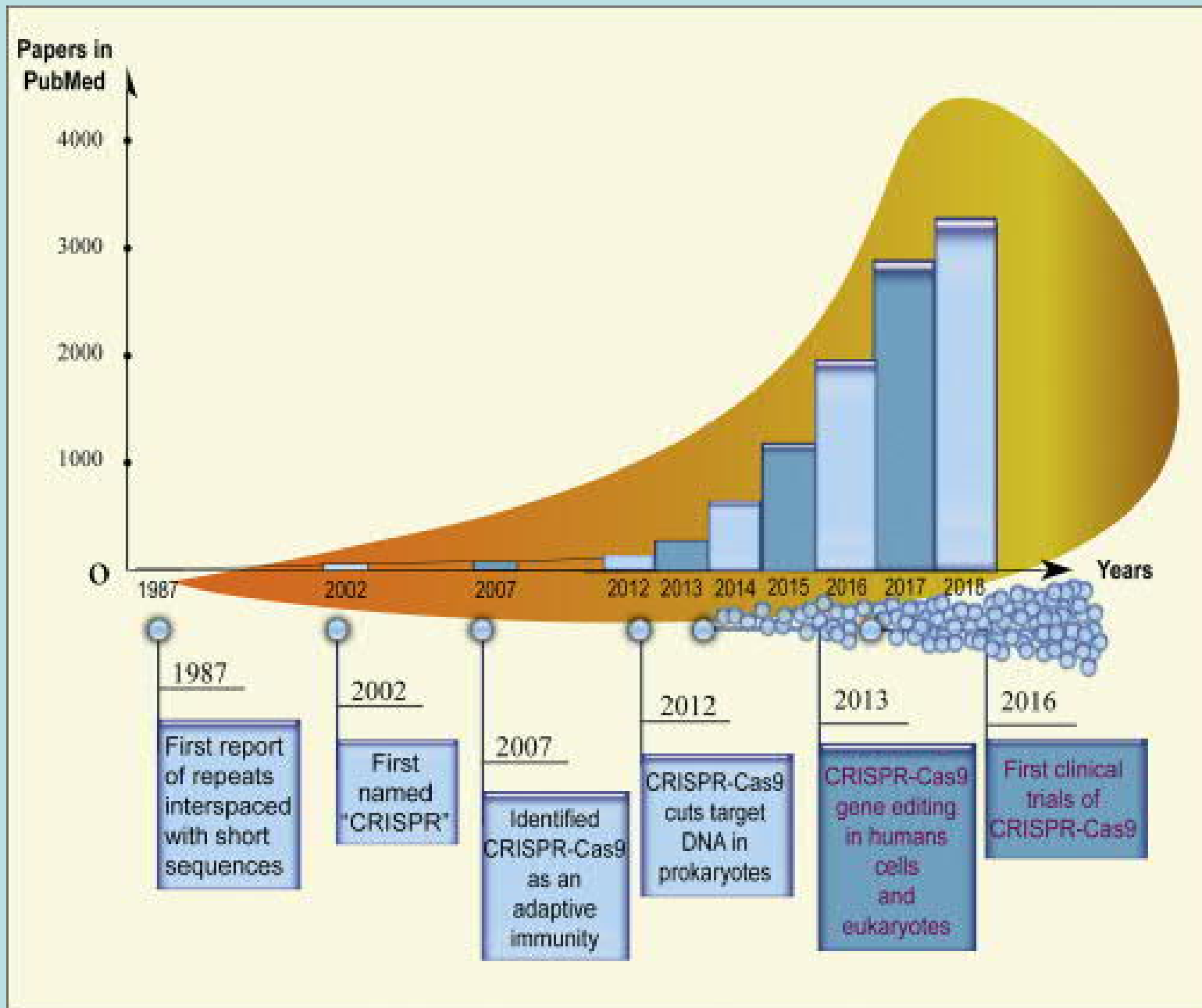
2012 CRISPR CLASSICO: premiato con il Nobel nel 2020, taglia entrambi i filamenti del DNA grazie alle affilate forbici molecolari dell'enzima Cas9.

2019 CRISPR - PRIME EDITING è stato inventato qualche anno fa, disattivando parzialmente le forbici e aggiungendo alla Cas9 un altro enzima (retrotrascrittasi, RT) , è più accurato ma può cambiare al massimo qualche decina di lettere.

2022 CRISPR PASTE a questi due pezzi è stato assemblato un terzo elemento (che sta per grande ricombinasi a serina, LSR). Il nuovo strumento a tre blocchi potrebbe rivelarsi utile per curare le malattie genetiche in cui non basta correggere un piccolo refuso ma è necessario sostituire un gene nella sua interezza.

How CRISPR works





Prime editing

L'ingrediente chiave è lo stesso degli altri sistemi CRISPR, ovvero l'enzima Cas9 che ha il pregio di scorrere fino a posizionarsi nel punto prescelto del genoma.

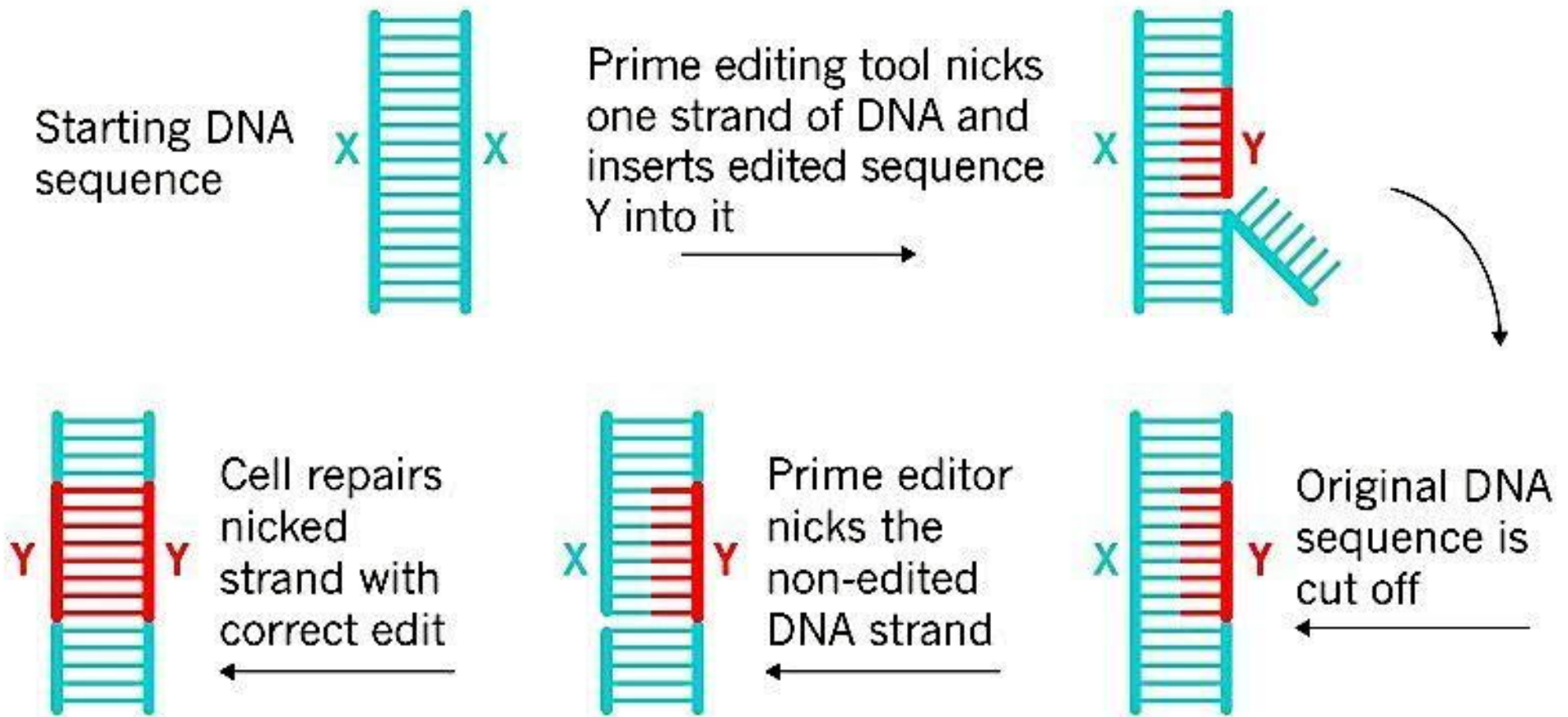
Nel prime editing si usa un **RNA** detto **peg** (da prime editing guide) che indica:

il sito prescelto sul genoma
suggerisce quali errori correggere.

Quindi il sistema è doppiamente programmabile.

PRECISION EDITOR

Prime editing reduces the number of unintended changes to a genome by inserting the edits researchers want to make into the DNA itself. This contrasts with CRISPR-Cas9, which relies on the cell's repair system to make the changes.



Crispr-paste

È l'ultima evoluzione dell'editing genetico e servirà ad inserire decine di migliaia di lettere in siti prescelti del genoma con elevata efficienza e pochissimi errori

In questo modo l'editing non è più soltanto correzione di refusi ma diventa scrittura vera e propria del DNA, attraverso tre passaggi.

L'ispirazione

L'ispirazione arriva dal mondo microbico e dalla guerra ancestrale in corso tra batteri e virus.

I virus devono sfruttare le risorse dei loro ospiti per potersi replicare e hanno evoluto un armamentario di enzimi a questo scopo.

I ricercatori si sono concentrati, in particolare, sulle **ricombinasi**, degli enzimi che possono catalizzare l'inserzione di lunghi pezzi di DNA senza effettuare il taglio della doppia elica e senza dover fare affidamento sui naturali sistemi di riparazione della cellula per saldare la lesione.

Evitare questo taglia-e-incolla è auspicabile, perché può causare mutazioni indesiderate e riarrangiamenti cromosomici

PASTE acronimo

La tripletta di enzimi, dunque, è costituita da una variante di CRISPR accessoriata con due effettori, il primo dei quali prepara il terreno al secondo.

Nel loro insieme questi tre elementi costituiscono un nuovo strumento chiamato PASTE, che nel linguaggio comune significa incollare ma è anche un acronimo che sta per

“programmable addition via site-specific targeting elements”.

In pratica il taglia-e-incolla è diventato incolla-senza-tagliare (e fallo pure in grande).

Crispr-paste

Uno: CRISPR va a bersaglio, posizionandosi come un cursore nel punto giusto del testo.

Due: la retrotrascrittasi inserisce una breve sequenza (meno di 50 lettere) che funziona come sito di inserzione per il grosso del testo da importare.

Tre: la ricombinasi riconosce il sito e inserisce la sua integrazione al testo, che può essere equivalente a un intero paragrafo, lungo decine di migliaia di lettere.

Crispr-paste

PASTE può ambire a sostituire in blocco una copia difettosa di un gene con una copia funzionante. Se i difetti da correggere lungo un gene sono numerosi, infatti, non ha senso intervenire in modo mirato lettera per lettera, meglio fornire l'intero blocco, come si fa con la terapia genica classica ma con il vantaggio di poter scegliere il punto di atterraggio del gene sano nel genoma.

Tra le ipotesi applicative che vengono esplorate ci sono la fibrosi cistica e l'emofilia, ma anche la malattia di Huntington dove è necessario rimuovere una sfilza di sequenze ripetute. Comunque è bene ribadire che la tecnologia non è ancora pronta a fare il salto nella clinica.

Per ora i ricercatori hanno soltanto iniziato a testarla in laboratorio, sia ex vivo che in vivo, ovvero sia su cellule coltivate (linfociti ed epatociti umani) sia all'interno del corpo di cavie animali (fegato di topo)

Genetica 4



Grazie

Rita Dougan 2023