

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA**

**FACOLTÀ DI FARMACIA**  
*Scuola di Specializzazione in Biochimica Clinica*



*Tesi di Specializzazione:*

**“Approcci tradizionali e innovativi per la cura  
dell’immunodeficienza grave combinata (SCID):  
attualità e prospettive in terapia genica”**

RELATORE

Chiar.mo Prof. Antonio Lucacchini

Chiar.mo Prof. Mauro Pistello

CANDIDATA

Dr.ssa Catia Fausto

**Anno Accademico 2011-2012**

*A chi crede come me,  
che nella vita tutto è possibile*

# INDICE

<i>Riassunto</i> .....	1
<i>Abstract</i> .....	2
<i>Introduzione</i> .....	3
<b>Cap. 1. Immunodeficienze primarie e secondarie</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1. Le immunodeficienze primarie</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2. Le immunodeficienze secondarie</b> .....	<b>6</b>
<b>Cap. 2. Malattie con immunodeficienza grave combinata (SCID)</b> .7	
<b>2.1. Sintomatologia</b> .....	<b>10</b>
<b>2.2. Come si arriva alla diagnosi</b> .....	<b>10</b>
<b>2.3. Terapia</b> .....	<b>11</b>
<b>Cap. 3. La SCID da deficit di adenosina deaminasi (ADA)</b> .....	<b>12</b>
<b>3.1. Le basi molecolari della SCID-ADA</b> .....	<b>12</b>
<b>3.2. Sintomi</b> .....	<b>14</b>
<b>3.3. Diagnosi</b> .....	<b>14</b>
<b>3.4. Difetti immunologici nel deficit di ADA</b> .....	<b>14</b>
<b>3.5. Difetti non immunologici nel deficit di ADA</b> .....	<b>15</b>
<b>3.6. Difetti cognitivi e comportamentali</b> .....	<b>15</b>
<b>3.7. Gestione del deficit di ADA</b> .....	<b>16</b>
<b>Cap. 4. Opzioni terapeutiche per la cura della SCID-ADA</b> .....	<b>17</b>
<b>4.1. Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT)</b> .....	<b>18</b>
4.1.1 Il regime di condizionamento.....	19
4.1.2. L'obiettivo terapeutico nel trapianto di midollo osseo allogenico.....	20
4.1.2.1. Il trapianto singenico.....	21

4.1.2.2. <i>Il trapianto di midollo osseo allogenico da donatore familiare</i> .....	21
4.1.2.3. <i>Il trapianto di cellule staminali periferiche allogeniche da donatore familiare</i> .....	22
4.1.2.4. <i>Il trapianto di midollo osseo allogenico da donatore volontario non familiare</i> .....	22
4.1.2.5. <i>Il trapianto di cellule staminali da donatore aploidentico</i> .....	22
4.1.2.6. <i>Il trapianto di cellule staminali emopoietiche da sangue di cordone ombelicale</i> .....	22
4.1.3. <i>Le nuove acquisizioni del trapianto con condizionamento non mieloablativo</i> .....	23
<b>4.2. La terapia sostitutiva enzimatica (ERT)</b> .....	<b>31</b>
<b>4.3. La terapia genica con l'uso dei vettori retrovirali</b> .....	<b>35</b>
<b>4.4. La terapia genica di HSC ingegnerizzate con vettori retrovirali</b> .....	<b>36</b>
<b>4.5. La terapia genica di HSC ingegnerizzate con vettori lentivirali</b> .....	<b>38</b>
<b>Cap. 5. La storia della terapia genica</b> .....	<b>40</b>
<b>Cap. 6. Terapia genica e vettori virali</b> .....	<b>46</b>
6.1. <b>Vettori retrovirali</b> .....	<b>48</b>
6.2. <b>Vettori lentivirali</b> .....	<b>50</b>
6.3. <b>Vettori adenovirali</b> .....	<b>52</b>
6.4. <b>Vettori adeno-associati</b> .....	<b>53</b>
6.5. <b>Vettori erpetici</b> .....	<b>54</b>
6.6. <b>Vettori poxvirali</b> .....	<b>54</b>
6.7. <b>Vettori da altri virus</b> .....	<b>55</b>
<b>Cap. 7. Uno sguardo alle prospettive future: le nucleasi zinc-finger</b> .....	<b>56</b>

<b>7.1. Le nucleasi attivatori trascrizionali simil effettori (TALENs).....</b>	<b>57</b>
<i>Conclusioni .....</i>	<i>63</i>
<i>Riferimenti bibliografici .....</i>	<i>64</i>

## Riassunto

Le SCID (malattie con immunodeficienza grave combinata) sono primariamente malattie prenatali che originano da difetti genetici. La maggior parte di queste anomalie si riferisce a fattori specifici per il sistema immunitario e che causano deficit nello sviluppo di cellule linfoidi. L'immunodeficienza combinata grave (SCID), causata da deficit di adenosina deaminasi (ADA) rappresenta circa il 10% - 15% di tutti i casi di SCID. L'ADA è un enzima coinvolto nella via di recupero delle purine che catalizza la deaminazione della deossiadenosina (dAdo) e dell' adenosina (Ado) in deossinosina e inosina rispettivamente, ed è espressa in tutti i tessuti del corpo. L'assenza di attività enzimatica dell'ADA, dovuta a mutazioni naturalmente ereditate nel gene corrispondente, porta alla formazione di substrati intracellulari ed extracellulari, il cui accumulo provoca effetti clinici più drammatici nel sistema immunitario con linfopenia grave accompagnato da uno sviluppo anormale di cellule T, B e natural killer (NK).

La carenza di ADA, come altre forme di SCID, porta a morte il soggetto nel primo anno di vita e richiede quindi un intervento precoce. Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT) da donatore compatibile è l'approccio terapeutico più utilizzato. In assenza di un adatto donatore, possono essere intrapresi trapianti aploidentici da un donatore parentale, associati però a maggiori complicazioni e ridotte possibilità di successo. A differenza di altre forme di SCID, per deficit di ADA sono disponibili due altre opzioni, ovvero la terapia di sostituzione enzimatica con polietilene glicole modificato ADA e la terapia genica di HSCT autologhe ingegnerizzate. La terapia enzimatica sostitutiva con PEG-ADA offre buoni miglioramenti metabolici, ma non garantisce il ripristino funzionale del sistema immunitario lasciando i pazienti suscettibili alle infezioni.

La terapia genica per la SCID-ADA utilizzava linfociti del sangue periferico o cellule CD34 + isolate da sangue di cordone ombelicale. Successivamente sono state utilizzate HSCT da midollo osseo ingegnerizzate con vettori retrovirali contenenti il cDNA di ADA. In situazioni in cui il trasferimento genico *ex vivo* in HSCT conferisce un forte vantaggio selettivo, la procedura è una valida alternativa al trapianto aploidentico. L'utilizzo di vettori lentivirali auto-inattivanti potrebbe aumentare ancora l'efficienza ed il profilo di sicurezza nel trattamento terapeutico di ADA con HSCT ingegnerizzate.

Prospettive future nella terapia genica si basano su sistemi di ricombinazione sito specifici che consentono la correzione del gene difettivo nella stessa cellula. Questa tecnologia, chiamata di "genoma editing" è in uso in una serie di modelli animali e in sperimentazione clinica nell'uomo, aprendo così le porte ad una serie di nuove possibilità sperimentali e terapeutiche nella cura della SCID.

## Abstract

Severe combined immunodeficiency diseases (SCID) are primarily prenatal illnesses that arise from several genetic defects. These abnormalities are typically related to specific factors of the immune system impairing the development of the lymphoid-specific lineage. The adenosine deaminase (ADA)-deficient SCID (ADA-SCID) accounts for 10-15% SCID cases. ADA is an enzyme involved in the purine salvage pathway that catalyses the deamination of deoxyadenosine (dAdo) and adenosine (Ado) to deoxyinosine and inosine respectively, and is expressed in all tissues of the body. The absence of ADA enzyme activity through naturally inherited mutations in the encoding gene leads to the accumulation of intracellular and extracellular substrates with dramatic consequences to the immune system and causing severe lymphopenia with abnormal development of T, B and natural killer (NK) cells.

ADA deficiency, like other forms of SCID, is invariably fatal in the first year of life and requires early intervention. Haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) from a fully matched donor is the first-line of therapy. In the absence of a suitable matched donor, haploidentical transplants from a parental donor can be considered, but these are associated with more complications and lower success rates. Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) remains the mainstay of treatment but, unlike for other SCIDs, other treatment options are available are the enzyme replacement therapy with polyethylene glycol-modified ADA (PEG-ADA) and autologous HSCT gene therapy. Enzyme replacement therapy with PEG-ADA offers good metabolic improvement, but suboptimal correction of immunological defects leaves patients susceptible to infection.

Early gene therapy studies for SCID-ADA utilized peripheral blood lymphocytes or CD34+ cells isolated from patient's umbilical cord blood. Subsequent clinical trials implied transduction and reinfusion of bone marrow cells. Until now all patients were treated HSCT engineered with retroviral vectors containing the ADA cDNA. In situations where *ex vivo* gene transfer into HSCT confers a strong selective advantage, this procedure is a suitable alternative to haploidentical transplantation. The use of self-inactivating lentiviral vectors might further improve efficiency and safety profile of ADA-gene therapy.

Future prospects in gene therapy are based on site specific recombination that allows gene repair within the same cell. This strategy, called "genome editing", is applied in several animal models and clinical procedures, thus opening the way to new experimental and therapeutic approaches for SCID treatment.

Such "genome editing" is now established in human cells and a number of model organisms, thus opening the door to a range of new experimental and therapeutic possibilities to treat the severe combined immunodeficiency (SCID).

## **Introduzione**

Studi sull'immunodeficienza grave combinata (SCID), un gruppo di rare malattie monogeniche, hanno fornito risultati importanti sulla fisiologia dello sviluppo del sistema immunitario. La caratteristica comune di queste malattie è il blocco del differenziamento delle cellule T, sempre associata ad una alterazione diretta o indiretta dell'immunità indotta anche dalle cellule B. L'identificazione delle basi fisiopatologiche della SCID ha portato allo sviluppo della terapia molecolare come alternativa al trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (HSC). Significativi risultati hanno dimostrato l'efficacia crescente del trasferimento genico di HSC umane. Lo sviluppo di vettori di nuova generazione e con sempre maggiore efficienza, specificità, e sicurezza ha portato all'uso di vettori lentivirali nel trattamento terapeutico della SCID.

Esperimenti recenti basati sulla possibilità di riparare il gene difettoso all'interno della cellula per ricombinazione sito-specifica ha allargato gli orizzonti terapeutici per la SCID.

## Cap. 1. Immunodeficienze primarie e secondarie

Il sistema immunitario svolge il compito di proteggere i vertebrati dall'attacco di diversi agenti nocivi, quali batteri, virus, funghi e protozoi. Quando uno o più componenti del sistema immunitario non è in grado di assolvere, in tutto o in parte, a questa funzione, si instaurano quadri patologici definiti complessivamente immunodeficienze.

Le immunodeficienze vengono classificate in **primarie** e **secondarie**. Le **immunodeficienze primarie** sono causate da mutazioni a carico di geni che controllano il sistema immunitario e si manifestano clinicamente con infezioni ricorrenti nei bambini, benché anomalie più lievi possano evidenziarsi anche in età più avanzata. Le **immunodeficienze secondarie** sono la conseguenza di altre malattie, o insorgono per effetto di fattori ambientali (malnutrizione) o di particolari terapie farmacologiche. La maggior parte delle immunodeficienze generalmente si accompagna ad un'aumentata suscettibilità alle infezioni e ad un'aumentata incidenza di neoplasie e di malattie autoimmuni.

### 1.1 Le immunodeficienze primarie

Le immunodeficienze congenite o primarie possono essere classificate in base alla branca del sistema immune colpita: 1) a prevalente compromissione dei linfociti B e della risposta anticorpale 2) a prevalente compromissione dei linfociti T e della risposta cellulo-mediata, 3) deficit combinati (dei linfociti T e B); da cui le immunodeficienze prendono il nome di "combinata" e, se il difetto è molto grave, di "immunodeficienza combinata grave" (o **SCID: severe combined immunodeficiency disease**), 4) deficit dei fagociti e della fagocitosi, 5) deficit del complemento e 6) deficit associati ad altre anomalie. Escludendo il deficit selettivo di IgA (in genere asintomatico), i difetti delle cellule B costituiscono il 50% delle immunodeficienze primarie; i deficit delle cellule T circa il 3%; i difetti combinati e quelli associati ad altre anomalie il 27%; i deficit della fagocitosi il 18%; e i difetti del complemento il 2% (**Tabella 1**). Si calcola che l'incidenza cumulativa delle immunodeficienze primarie sintomatiche sia di 1/10000 nati; negli USA, si verificano circa 400 nuovi casi l'anno. Dal momento che molte immunodeficienze primarie sono ereditarie o congenite, esse esordiscono nei lattanti e nei bambini, per cui circa l'80% degli individui affetti ha meno di 20 anni e, poiché molte sindromi presentano un'ereditarietà recessiva legata al cromosoma X, il 70% di esse colpisce i maschi. La prognosi delle immunodeficienze primitive è quanto mai variabile, ma alcune immunodeficienze possono essere curate con il trapianto di cellule staminali. La maggioranza dei pazienti affetti da immunodeficienze anticorpali o da un deficit del complemento ha una prognosi favorevole con un'aspettativa di vita pressoché normale, a patto che venga identificata precocemente, sia trattata con regolarità e non sia affetta da malattie

croniche concomitanti (ad esempio una patologia polmonare). Altri pazienti con immunodeficienza, come quelli con disordini della fagocitosi, con disordini combinati o con alterazioni della produzione anticorpale affetti da infezioni croniche, hanno una prognosi meno buona: la maggior parte è cronicamente malata e necessita di un trattamento intensivo (immunoglobuline, antibiotici, drenaggio posturale, interventi chirurgici, ecc.). Infine, altri pazienti con immunodeficienza hanno una prognosi *quoad vitam* decisamente sfavorevole (ad esempio, quelli affetti da atassiateleangectasia e quelli con immunodeficienza combinata grave che non sono stati sottoposti a trapianto).

Disease	Natural Mutant	Protein	Function
<b>Genes Discovered by Studying Primary Immunodeficiencies</b>			
	scid	DNA-PKcs	VDJ (NHEJ)
SCID		Artemis	VDJ (NHEJ)
SCID		Cernunnos, XLF	VDJ (NHEJ)
T cell deficiency		Orai-1, CRACM1	Ca channel
Agammaglobulinemia		Btk	cell activation
XLP		SAP	coactivation (SLAM family), NKT
AT		ATM	DNA lesion sensing
NBS		Nibrin (NBS1)	DNA repair
DC		Dyskerin	telomere maintenance
T cell deficiency (HLA II expression)		RFXAP, ANK, RFX5, CIITA	HLA class II transcription
WAS		WASP	cell cytoskeleton, migration
IPEX	scurfy	FOXP3	Treg function
APECED		AIRE	negative selection of T cells
	motheaten	SHP-1	phosphatase, regulation
FHLH		Munc 13-4	exocytosis of lytic granules
CGD		gp91phox, p22phox, p47phox, p67phox	NADPH oxidase
<b>Previously Known Genes but Function Understood by the Study of Primary Immunodeficiency Diseases</b>			
SCID		$\gamma_c$ , JAK3	T (NK) cell development
SCN		HAX-1	prevention of apoptosis (neut.)
LAD		$\beta_2$ integrin	adhesion
HIGM		CD40L	activation of Ig CSR
HIGM		AID	Ig CSR and SHM
	lpr, gld	fas, fasL	apoptosis
Griscelli	ashen	Rab27a	exocytosis of lytic granules
FHLH		syntaxin11	cytotoxicity
XLP2		XIAP	control of apoptosis (NKT)
Abbreviations: SCID (scid), severe combined immunodeficiency; DNA PKcs, DNA dependent-protein kinase, catalytic subunit; VDJ, V(D)J recombination; NHEJ, nonhomologous end-joining; XLF, XRCC4-like factor; Btk, Bruton tyrosine kinase; XLP, X-linked proliferative syndrome; SAP, SLAM-associated protein; AT, ataxia telangiectasia; NBS, Nijmegen Breakage syndrome; DC, dyskeratosis congenita; WAS, Wiskott-Aldrich syndrome; WASP, Wiskott-Aldrich syndrome protein; IPEX, immunoproliferative enteropathy X-linked syndrome; Treg, regulatory T cells; APECED, autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dysplasia; FHLH, familial hemophagocytic lymphohistiocytosis; CGD, chronic granulomatous disease; SCN, severe congenital neutropenia; LAD, leukocyte adhesion deficiency; HIGM, hyper-IgM syndrome (Ig class switch recombination deficiency [CSR]); SHM, somatic hypermutations; AID, activation-induced deaminase; lpr, lymphoproliferation; gld, generalized lymphadenopathy disease; XLP2, X-linked proliferative syndrome type 2; XIAP, X-linked inhibitor of apoptosis.			

Tabella 1: Geni e immunodeficienze primarie. Fischer *et al.*, 2007

## **1.2. Le immunodeficienze secondarie**

Si definiscono immunodeficienze secondarie o acquisite le immunodeficienze non ereditarie dovute generalmente ad un coinvolgimento secondario del sistema immune. Esse si manifestano con una sintomatologia variabile ed in relazione alla eterogeneità dei fattori eziologici e dei processi morbosi in grado di indurre l'immunodeficienza. A differenza delle immunodeficienze primitive, che rimangono delle entità cliniche estremamente rare, le immunodeficienze secondarie sono piuttosto frequenti e di notevole importanza pratica in medicina.

La frequenza delle immunodeficienze varia enormemente, da malattie estremamente diffuse, come il deficit selettivo di IgA che ha una frequenza di 1:500, 1:700 nella popolazione generale, a forme come la agammaglobulinemia di Bruton (1:100.000) o le SCID (1:50.000).

## Cap. 2. Malattie con immunodeficienza grave combinata (severe combined immunodeficiency diseases - SCID)

Le SCID rappresentano un capitolo molto importante dell'immunologia pediatrica e della pediatria in generale. La possibilità di curarle impone un precoce sospetto diagnostico, spesso già in ambito neonatologico, e quindi una conoscenza più diffusa di come queste malattie si manifestano, evolvono e delle modalità con cui fare diagnosi precoce e certa. Inoltre le SCID sono in realtà un insieme assai eterogeneo di malattie diverse, ciascuna con caratteristiche genetiche, immunologiche e cliniche proprie, quindi con la necessità di un approccio terapeutico altamente differenziato.

Più di 50 anni fa, il termine “immunodeficienza grave combinata” (SCID) è stato coniato per designare condizioni rare e letali in cui i bambini muoiono a causa di una serie di infezioni associate ad una mancanza di linfociti nel sangue. Successivamente è stato riconosciuto che la SCID è dovuta a vari difetti genetici che compromettono il normale processo di differenziamento dei linfociti T e (in alcuni casi) a blocchi aggiuntivi nel differenziamento dei linfociti B e / o dei linfociti *natural killer* (NK). L'analisi molecolare di queste condizioni ha generato un flusso di informazioni sui punti chiave nello sviluppo dei linfociti (**Buckley R.H., 2004**). Il termine “SCID” è diventato così molto popolare nella comunità immunologica, allorquando la scoperta di naturali mutanti di topo SCID permise di utilizzarli ampiamente nello studio dell'ontogenesi dei linfociti ed usarli come destinatari per trapianti allogenici e, soprattutto, xenogenici (umani) (**Fischer A. et al., 2010**).

Le SCID sono un gruppo eterogeneo di malattie a trasmissione autosomica recessiva o legate al cromosoma X, caratterizzate dall'assenza o da un deficit severo di tutte le funzioni immunitarie antigene-specifiche, sia mediate dai linfociti T che da linfociti B. In **Tabella 2** è riportata una classificazione delle forme principali con le alterazioni numeriche a carico dei linfociti T o dei B, l'ereditarietà e il prodotto genico coinvolto (**Fulvio P. et al., 1999**).

SCID	Frequenze (% dei casi)	T linfociti	B linfociti	Ereditarietà	Prodotto genico
Disgenesia reticolare	rara	↓	↓	AR	?
SCID con assenza di T e B linfociti	20-25	↓	↓	AR	RAG1/2
SCID con B linfociti	50	↓	No ↑	XR AR	catena $\gamma$ comune JAK-3
Deficit di ADA	20	↓	↓	AR	ADA
Deficit di PNP	2-4	↓	No ↓	AR	PNP
Sindrome di Omenn	rara	No ↑	↓	AR	?
Deficit di espressione dell'HLA di classe II	rara	N (↓ CD4)	N	AR	CIITA, RFX-5 (*)
Deficit dei meccanismi di traduzione	rari	No ↓	N	AR	Zap70 e altri ignoti

N: numero normale; ↓: numero basso; ↑: numero elevato; AR: ereditarietà autosomica recessiva; XR: ereditarietà X recessiva; (\*) CIITA, RFX-5 fattori di trascrizione dei geni strutturali per le molecole HLA di classe II.

Tabella 2. Le principali immunodeficienze combinate gravi (SCID). Fulvio P. *et al.*, 2009

SCID con ipoplasia emopoietica generalizzata (disgenesia reticolare). La disgenesia reticolare è una forma molto rara di SCID causata dall'assenza o dalla mancata differenziazione della cellula staminale emopoietica; oltre ai T e ai B linfociti, mancano quindi anche le altre cellule staminali emopoietiche. Nel 50% dei bambini affetti, è implicata una SCID con linfociti B: in tre quarti dei casi la forma è X recessiva, mentre in un quarto è autosomica recessiva. Nella forma X recessiva il gene responsabile è stato mappato nella regione Xq13 e codifica per la catena  $\gamma$  comune al recettore della interleuchina-2 (IL-2), della interleuchina-4 (IL-4) e della interleuchina-7 (IL-7); essendo difettivi questi recettori, viene ad interrompersi la maturazione intratimica dei linfociti T.

Gran parte delle SCID con linfociti B ad ereditarietà autosomica recessiva, sono causate invece da un difetto del gene che codifica per una tirosin chinasi, JAK-3 necessaria per trasdurre dalla membrana cellulare al nucleo i segnali che pervengono alla cellula, tramite catena  $\gamma$  comune, con l'IL-2, l'IL-4 e l'IL-7; l'effetto sul sistema immunitario è ovviamente simile a quello dell'assenza di catena  $\gamma$  comune: arresto della differenziazione intratimica e conseguente assenza di linfociti T maturi (Macchi P. *et al.*, 1995).

La SCID-X1 è la forma più comune (circa il 50% dei casi) e meglio caratterizzata di SCID, è causata da un difetto della catena  $\gamma$  comune ( $\gamma_c$ ) al recettore delle citochine;  $\gamma_c$  è codificato sul cromosoma X e fa parte dei recettori delle interleuchine (IL) IL-2R, IL-4R, IL-7R, IL-9R, IL-15R e IL-21R (Puck J.M. *et al.*, 1993; Noguchi M. *et al.*, 1993). In assenza di segnali attraverso questi importanti recettori, la differenziazione delle cellule T e NK (*natural killer*) viene arrestata, con conseguente grave immunodeficienza.

Alla base della SCID con assenza di linfociti T e B vi è l'assenza selettiva della cellula staminale linfoide. Questa forma di immunodeficienza è autosomica recessiva e colpisce il 25% circa dei bambini affetti da SCID. Dal punto di vista molecolare è caratterizzata da un difetto nel processo di riarrangiamento dei geni immunoglobulinici e del recettore T, indispensabile per la generazione di linfociti T e B normali, in grado di riconoscere l'antigene; in alcuni casi sono certamente in causa geni che codificano per enzimi coinvolti nel processo di riarrangiamento come RAG1 e RAG2. Nei pazienti affetti da questa immunodeficienza - già denominata "di tipo svizzero" - sono presenti le cellule NK che evidentemente derivano direttamente dalla cellula staminale ematopoietica e non da quella staminale linfoide (**Candotti F. et al., 1992; Fischer A. et al., 1993**).

Il deficit di ADA (adenosina deaminasi), ereditato con modalità autosomica recessiva, rappresenta la causa del 20% circa delle SCID. Sono state descritte sia delezioni, sia mutazioni puntiformi a carico del gene che codifica per l'enzima, localizzato sul cromosoma 20 (20q13). L'enzima è espresso in tutti i tessuti del corpo, sebbene a livelli variabili, con la più alta attività nel timo e nei tessuti linfoidei. In mancanza di ADA, enzima della "via di salvataggio" del metabolismo purinico, si accumulano nei linfociti metaboliti fosforilati dell'adenosina che esercitano un effetto tossico, soprattutto sui linfociti T. I pazienti affetti da deficit di ADA presentano infatti una marcata riduzione dei linfociti T circolanti a fronte di un numero variabile di linfociti B (**Giblett E.R. et al., 1972**).

Il deficit di nucleoside fosforilasi purinica (PNP), altro enzima della "via di salvataggio" delle purine, è una causa assai più rara di SCID. È causato da una mutazione del gene PNP, localizzato sul braccio lungo del cromosoma 14 (14q13). Oltre alla maggiore suscettibilità, gravità e ricorrenza delle infezioni dovute al severo deficit dell'immunità T-dipendente, la SCID è caratterizzata dalla frequente insorgenza di anemia emolitica, tetraplegia spastica e linfosarcoma (**Markert M.L. et al., 1991**).

I pazienti affetti da sindrome di Omenn presentano precocemente infezioni ricorrenti, linfadenopatia, epatosplenomegalia, infiltrazione polmonare, stentata crescita e un grave eczema diffuso. Dal punto di vista immuno-ematologico si evidenziano pancitopenia e ipergammaglobulinemia. Si ritiene che il difetto sia dovuto al mancato funzionamento di un enzima implicato nel riarrangiamento dei geni immunoglobulinici e del recettore T e che si originino così cloni di linfociti T autoreattivi (**Karol et al., 1983**).

Il deficit di espressione degli antigeni HLA di classe II viene ereditato con modalità autosomica-recessiva e comporta una grave alterazione della risposta antigene-specifica, poiché la presenza delle molecole HLA di classe II è indispensabile per una corretta presentazione degli antigeni alle cellule immunocompetenti. Questa grave forma di SCID comporta una importante alterazione della funzione immunitaria cellulo-mediata con marcata riduzione della risposta proliferativa agli antigeni e diminuita sintesi anticorpale in risposta a stimolazioni antigeniche

(per esempio, vaccinazioni). Quest'ultima si traduce spesso in una franca ipogammaglobulinemia. (Griscelli C. *et al.*, 1989).

Altre forme di SCID elencate in Tabella 2 sono piuttosto rare. Particolarmente interessanti sono le SCID da difetto dei meccanismi di trasduzione; ne è prototipo quella causata da deficit di ZAP-70, tirosin chinasi coinvolta nella trasduzione al nucleo dei segnali provenienti dal recettore T: in questa forma sono virtualmente assenti i linfociti CD8 (Chatila T. *et al.*, 1989).

## 2.1 Sintomatologia

Poiché il deficit immunologico è talmente grave da causare la morte entro il primo anno di vita, la SCID è per definizione una malattia dell'infanzia. Il quadro clinico è caratterizzato da episodi ricorrenti di polmonite, diarrea cronica, infezioni persistenti da *Candida* che colpiscono la bocca, l'esofago e la cute. Benché in teoria i pazienti affetti da SCID siano suscettibili alle infezioni da parte di qualsiasi microrganismo, in realtà prevalgono le infezioni opportunistiche, provocate da microrganismi che diventano patogeni in caso di immunodepressione.

L'identificazione del germe che causa l'infezione (e la sede della infezione) non si limita a suggerire la condizione di immunodeficienza, ma dà informazioni anche sulla natura del possibile difetto immunologico alla base della patologia: i soggetti che hanno un difetto dei B linfociti sono suscettibili ai batteri come lo *Pneumococco* o l'*Haemophilus influenzae* e ai virus. I soggetti che hanno un difetto prevalente dei linfociti T presentano infezioni sostenute soprattutto da *Pneumocystis carinii*, virus e funghi. I pazienti con difetto dei fattori del complemento hanno infezioni - soprattutto meningiti e sepsi- da *Meningococco* o da altre *Neisseriae*, mentre nei difetti dei fagociti, le infezioni sono causate soprattutto da batteri (*Stafilococco*) e colpiscono tipicamente la pelle e i linfonodi.

## 2.2 Come si arriva alla diagnosi

Nel sospetto clinico di immunodeficienza, l'emocromo, il dosaggio delle immunoglobuline e la conta delle sottopopolazioni linfocitarie sono i cosiddetti esami "di primo livello" sulla base dei quali è possibile stabilire se procedere a esami più complessi di analisi cellulare, molecolare o genetica, detti "di secondo livello".

L'emocromo (esame emocromocitometrico) è cruciale: un basso numero di linfociti (meno di  $1.000/\text{mm}^3$ ) è patognomonico di immunodeficienza combinata grave.

Altrettanto importante è la determinazione dei livelli di immunoglobuline: quando sono basse o del tutto carenti, si procede agli accertamenti di "secondo livello" per discriminare tra le diverse forme di ipogammaglobulinemia. Nel sospetto di un difetto dei linfociti T, si contano i linfociti T circolanti e le loro principali sottopopolazioni (CD3, CD4, CD8). Si procede con lo studio della risposta linfocitaria ai mitogeni e la misurazione dei loro "messaggeri" (citochine)

utilizzando stimoli diversi: è possibile così definire con precisione il difetto di questo tipo di cellule. Il kariogramma, la biopsia del linfonodo e la biopsia ossea sono utili per definire meglio l'immunodeficienza. Altri esami sono ancora più risolutivi e permettono diagnosi certa: ad esempio, per confermare la SCID da deficit di ADA o di PNP, è indispensabile dosare nei globuli rossi la concentrazione di questi due enzimi.

Infine, vanno brevemente ricordati gli esami genetici che devono essere sempre programmati in centri altamente specializzati: se si conosce il difetto del gene, lo si va a cercare direttamente nel DNA delle cellule. Per diagnosi prenatale vengono utilizzati i villi coriali che possono essere prelevati tra la prima e la 10<sup>a</sup> settimana di gestazione.

Se invece il difetto non è noto, è necessario valutarne indirettamente la possibile esistenza attraverso la misurazione dei suoi prodotti anche questo esame può essere applicato alla diagnosi prenatale, ma è fattibile a partire dal secondo trimestre di gravidanza (amniocentesi alla quindicesima settimana, esame del sangue fetale mediante funicolocentesi alla ventesima settimana).

### **2.3 Terapia**

Se non trattata, la SCID è una malattia rapidamente mortale. Una volta giunti alla diagnosi, è importante che i pazienti con SCID vengano controllati in strutture in grado di proteggere il bambino in ambiente sterile (letto a flusso laminare), somministrando al contempo antibiotici, antivirali, antifungini e immunoglobuline endovena. L'unica terapia risolutiva è al momento il trapianto di midollo osseo, ma la difficoltà nell'approccio consiste nel trovare donatori compatibili - generalmente un fratello o un genitore. Prima del trapianto il midollo osseo del ricevente viene irradiato, allo scopo di distruggere completamente i linfociti malati ed evitare il rigetto. Se il donatore non è compatibile al 100%, il midollo prelevato viene sottoposto a delle procedure di purificazione, per eliminare alcuni tipi di linfociti che potrebbero causare una reazione di rigetto "inversa" (cioè la reazione dei linfociti trapiantati contro i tessuti dell'ospite). Grazie ai progressi degli ultimi anni, la percentuale di successo del trapianto è piuttosto alta: in circa l'80% dei casi si arriva a guarigione, se il donatore è compatibile. Solo nella SCID da deficit di ADA è possibile ricorrere ad alternative terapeutiche. Tra queste, la terapia genica è di notevole interesse ed ha dato già alcuni risultati incoraggianti.

## Cap. 3. La SCID da deficit di adenosina deaminasi (ADA)

La SCID-ADA comprende il 10-15% di tutti i casi di SCID, è dovuta a una carenza genetica dell'enzima ADA, ed è stata casualmente identificata oltre due decenni fa. Questa malattia compromette in maniera gravissima il sistema immunitario, al punto che l'organismo è incapace di difendersi da qualsiasi agente infettivo (**Gelfand E.W. et al., 1983**).

L'incidenza di questa patologia è di un neonato su 200 mila nati fino a 1 su 1 milione di nuovi nati, ma non sempre è immediatamente riconoscibile (**Gaspar H.B. et al., 2009**).

### 3.1 Le basi molecolari della SCID-ADA

La malattia si trasmette come **carattere autosomico recessivo**. Le mutazioni responsabili della malattia riguardano il gene per l'enzima ADA, sono spesso di tipo puntiforme e sono localizzate sul cromosoma 20 nella regione q13. Sono state individuate inoltre anche delezioni a livello del promotore.

L'ADA è un enzima della via di "recupero" delle purine espresso in tutti i tipi cellulari, con i più alti livelli riscontrati nel timo.

È un enzima "*housekeeping*" ubiquitario che esiste principalmente in una forma monomerica citoplasmatica di 40-kDa. Una piccola percentuale dell'enzima è presente anche sulla superficie cellulare di fibroblasti, linfociti T e di altre cellule, come dimero complessato a due molecole di una "proteina combinata", ora identificata come CD26 nei linfociti T (**Gaspar H.B. et al., 2009**).

ADA catalizza le reazioni di conversione dell'adenosina (Ado) in inosina (Ino) e deossiadenosina (dAdo) in deossinosina (dIno), evento cruciale nei processi catabolici delle purine (**Figura 1**).

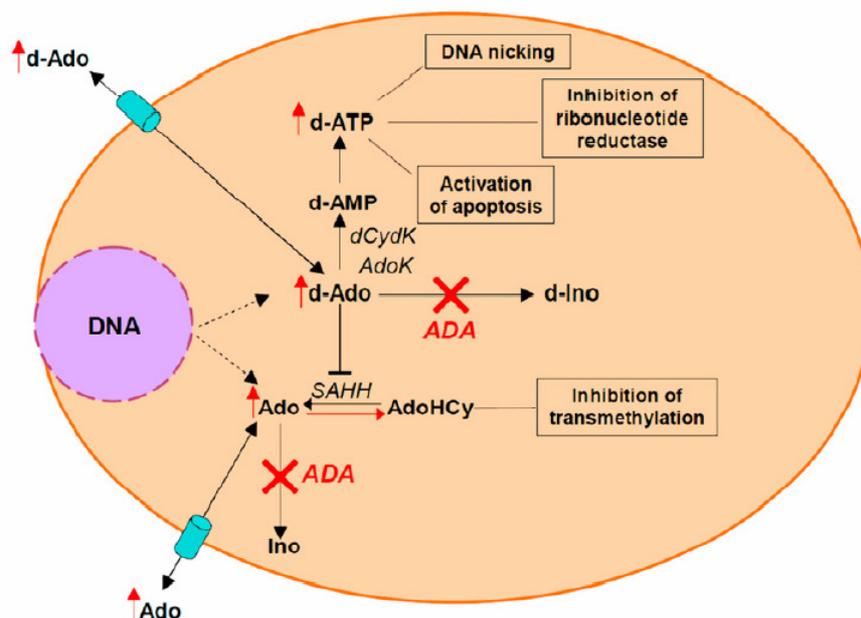


Figura 1. Patogenesi della carenza di ADA. Gaspar *et al.*, 2010

Recenti esperimenti hanno individuato e cristallizzato l'enzima murino. Inoltre, sono state identificate aree di conservazione evolutiva da *Escherichia coli* all'uomo (Wilson D. *et al.*, 1991; Chang Z.Y. *et al.*, 1991). L'enzima è composto da un tronco di otto fogli pieghettati ad H alternati con otto eliche, con altre quattro  $\alpha$  eliche. I fogli circondano il sito catalitico, con lo zinco posizionato sul fondo del tronco, sotto il sito di legame al substrato. L'inattesa presenza di zinco all'interno della tasca catalitica di ADA e in altri enzimi delle vie di recupero delle purine e pirimidine potrebbe spiegare la immunodeficienza associata con carenza di zinco.

In assenza di attività dell'ADA si ha intossicazione metabolica per l'accumulo di substrati e metaboliti, tra cui dAdo che si accumula nei compartimenti extracellulari e all'interno delle cellule, dove viene convertito dalla deossicitidina chinasi (dCydK) a deossiadenosina trifosfato (dATP). L'accumulo di entrambi dATP e dAdo ha effetti deleteri sullo sviluppo dei linfociti e sulla loro funzione ed è la principale causa dei difetti immunologici. dATP inibisce la ribonucleotide riduttasi, un enzima che partecipa alla replicazione e riparazione del DNA (Lee N. *et al.*, 1984), induce apoptosi in timociti immaturi (Apasov S.G. *et al.*, 2001), e interferisce con l'attività del terminale deossinucleotidil transferasi (TdT), limitando così la ricombinazione V (D) J e la diversità del recettore dell'antigene (Gangi-Peterson L. *et al.*, 1999). L'accumulo di dAdo inattiva l'enzima S-adenosilomocisteina idrolasi (SAHH) (Benveniste P. *et al.*, 1995), con conseguente inibizione delle reazioni di transmetilazione necessarie per un'efficace attivazione dei linfociti. Elevati livelli di Ado, agendo attraverso i recettori accoppiati alle proteine G della superficie cellulare, possono contribuire alla disfunzione immunitaria

(Hershfield M.S. *et al.*, 2005; Cassani B. *et al.*, 2008) e all'infiammazione polmonare associata alla mancanza di ADA (Blackburn M.R. *et al.*, 2005).

### 3.2 Sintomi

Il bambino affetto da SCID-ADA nasce sano, ma fin dai primi giorni il neonato contrae malattie infettive gravi che possono portare a morte prematura o arrecare danni permanenti.

Questa immunodeficienza è caratterizzata dalla presenza di pochissimi linfociti e incapaci di rispondere agli stimoli a causa di una loro non completa maturazione nel midollo osseo. Si riscontra, inoltre, l'assenza o scarsità di anticorpi nel siero e difetti sistemici nei polmoni, nel fegato, nei reni, nel cervello, e nello scheletro. Per questo motivo il bambino è costretto a vivere in un ambiente sterile, da qui il nome di "bambino bolla", e isolato al fine di evitare il contatto con patogeni. Se la patologia viene diagnosticata nei primi giorni di vita è possibile iniziare da subito le cure che gli consentono di guarire dalla malattia e tornare ad una vita normale. E' probabile quindi che lo screening diagnostico dell'immunodeficienza congenita venga inserita tra i test di diagnosi neonatale, finora preclusa visti i costi e la complessità dei metodi per diagnosticare la SCID-ADA.

### 3.3 Diagnosi

La diagnosi del deficit di ADA si esegue analizzando l'attività dell'enzima in linfociti, eritrociti e fibroblasti messi in cultura. Sono inoltre assai elevati i livelli d'adenosina e desossiadenosina e quest'ultima è anche molto aumentata nelle urine. La diagnosi può anche essere condotta nel periodo prenatale tramite l'analisi dei livelli di ADA negli eritrociti fetali o nelle cellule del liquido amniotico, dopo essere state messe in cultura.

### 3.4 Difetti immunologici nel deficit di ADA

Difetti immunologici associati alla carenza di ADA includono un ridotto sviluppo delle cellule T, B e NK e della loro funzione, assenza completa di immunità cellulare e umorale e infezioni ricorrenti. E' ben noto che la base metabolica della deficienza immunitaria delle cellule è connessa all'impatto fisiologico dei substrati ADA, adenosina e deossiadenosina. La deossiadenosina si comporta come un metabolita citotossico ed è considerato la causa primaria di linfotossicità in SCID-ADA, dove l'adenosina può funzionare come un trasduttore del segnale extracellulare che media una varietà di effetti fisiologici tramite la segnalazione del recettore dell'adenosina (Aisha V. *et al.*, 2009).

### 3.5 Difetti non immunologici nel deficit di ADA

L'espressione ubiquitaria di ADA porta ad un certo numero di difetti significativamente non immunologici. I pazienti SCID-ADA presentano anomalie costocondrali e displasie scheletriche (Cederbaum S.D. *et al.*, 1976), deficit neurologici che coinvolgono la funzione motoria (Hirschhorn R. *et al.*, 1980), sordità sensorineuronale bilaterale (Albuquerque W. *et al.*, 2004) e disfunzione epatica (Bollinger M.E. *et al.*, 1996). Manifestazioni non immunologiche si trovano anche in topi con deficit di ADA, che presentano una degenerazione epatica, polmonare e intestinale, nonché anomalie neurologiche (Turner C.P. *et al.*, 2003) con accumulo di dAdo e dATP e inibizione della S-adenosilomocisteina idrolasi nei tessuti colpiti.

### 3.6 Difetti cognitivi e comportamentali

I pazienti SCID-ADA mostrano difetti nella funzione cognitiva e comportamentale (Rogers M.H. *et al.*, 2001; Titman P. *et al.*, 2008) che spesso rimangono tali anche dopo correzione delle anomalie immunologiche con trapianto di midollo osseo, evidenziando così la natura sistemica della malattia.

In un lavoro di Rogers *et al.* (2001) sono state valutate le funzioni cognitive, comportamentali e lo sviluppo neurologico nei pazienti SCID-ADA ed i risultati confrontati con quelli di un gruppo caso-controllo di pazienti senza SCID-ADA. Un gruppo di pazienti affetti da SCID-ADA (n = 11) e pazienti senza SCID-ADA ma affetti da altre forme di SCID sono stati sottoposti a trapianto di midollo osseo. I soggetti sono stati poi esaminati con test standard di intelligenza appropriati all'età, test sul comportamento e sullo sviluppo neurologico.

In definitiva si è visto che le capacità cognitive non erano significativamente differenti tra i 2 gruppi, ma i pazienti affetti da SCID-ADA mostravano una correlazione inversa significativa tra i livelli di dATP al momento della diagnosi e del QI (P = 0,048) (Figura 2). Le valutazioni comportamentali hanno dimostrato che pazienti affetti da SCID-ADA rientravano comunque nel range patologico, mentre i valori per il gruppo controllo erano entro i limiti normali. Alterazioni del comportamento in pazienti con SCID-ADA hanno anche mostrato una significativa correlazione positiva con l'età (P = 0,026).

In conclusione la funzione cognitiva nei deficit di ADA è influenzata negativamente dalla gravità degli squilibri metabolici al momento della diagnosi. In aggiunta, pazienti affetti da SCID-ADA presentano significative anomalie comportamentali dopo il trapianto. Questi difetti non sono dovuti alla procedura di trapianto ma riflettono la natura sistemica della carenza di ADA (Rogers M.H. *et al.*, 2001).

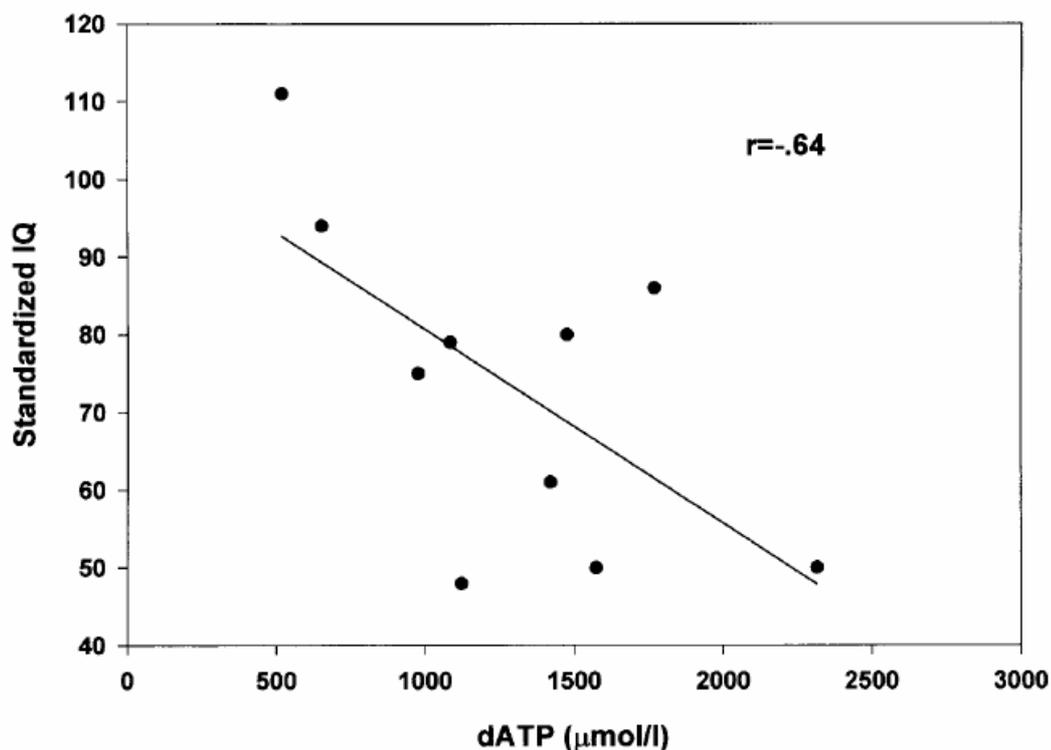


Figura 2. IQ standardizzato in pazienti con SCID-ADA mostra una correlazione inversa significativa con i livelli di dATP al momento della diagnosi. Rogers *et al.*, 2001

### 3.7 Gestione del deficit di ADA

Quando si parla di come gestire la SCID-ADA, è importante prendere in considerazione i principi per una terapia di successo. Il difetto di fondo è una carenza enzimatica che porta alla formazione di metaboliti tossici, che a loro volta hanno un effetto sui diversi sistemi degli organi, in particolare il sistema immunitario. Non è ancora del tutto chiaro se i linfociti da pazienti con deficit di ADA sono intrinsecamente anormali o se i difetti visti sono secondari agli effetti della dATP e dell'accumulo di dAdo. Inoltre, l'accumulo di metaboliti tossici può interferire con lo sviluppo dello stroma timico, maturazione, e funzione, con conseguente ridotta capacità di supportare lo sviluppo delle cellule T. Tuttavia, le tecnologie di trasferimento dell'enzima sembrano essere la chiave per una detossificazione di successo dei substrati metabolici e per promuovere il recupero delle difese immunitarie (Gaspar H.B. *et al.*, 2009).

## Cap. 4. Opzioni terapeutiche per la cura della SCID-ADA

Nel corso degli anni, sono stati sviluppati vari approcci terapeutici per la cura della SCID-ADA

(Figura 3):

- L'HSCT o trapianto di cellule staminali ematopoietiche
- L'ERT o terapia sostitutiva enzimatica
- La terapia genica

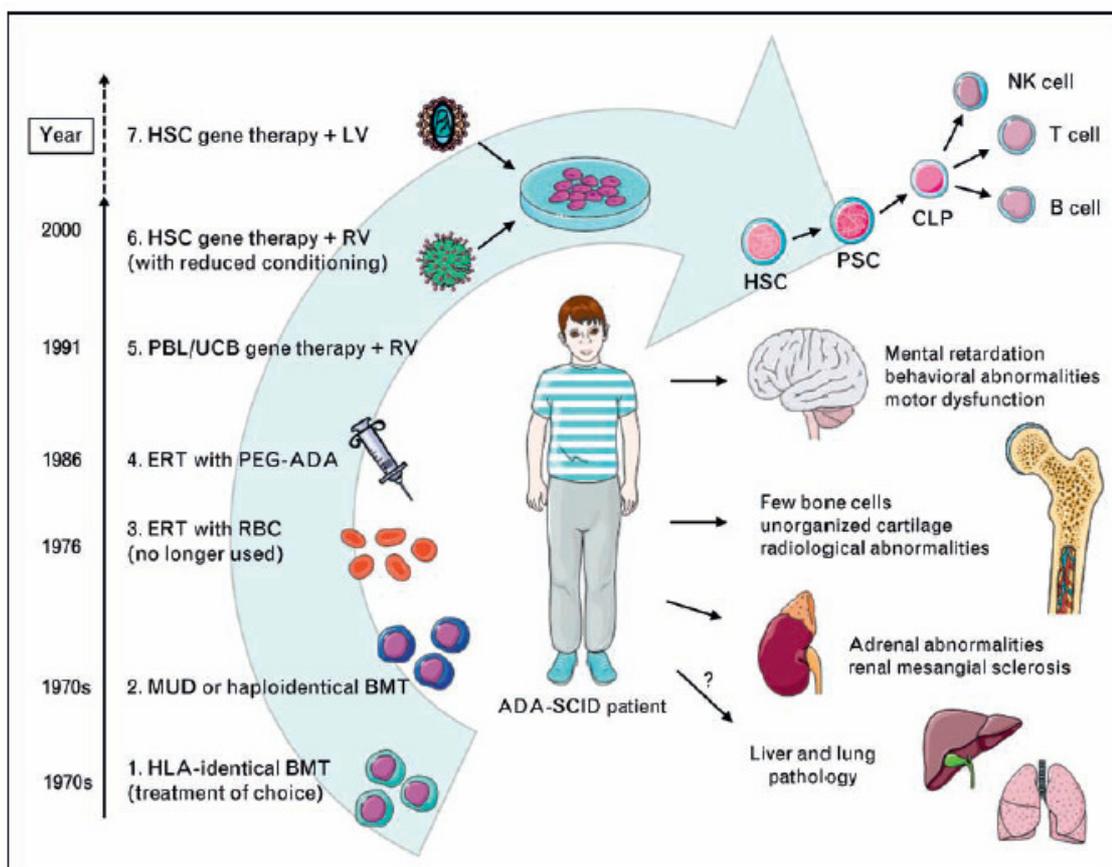


Figura 3. Passato, presente e sviluppo futuro delle opzioni terapeutiche nella SCID-ADA e le sue manifestazioni immuni e non immuni. Aiuti *et al.*, 2009

#### 4.1. Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (hematopoietic stem cell transplantation – HSCT)

Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (hematopoietic stem cell transplantation – HSCT) è l'unica possibilità di cura per la quasi totalità dei bambini affetti da SCID. Le percentuali di successo sono migliorate notevolmente negli ultimi decenni raggiungendo valori del 70-95% con percentuali dipendenti da eventuali complicanze.

L'HSCT, noto anche come trapianto di midollo osseo (**Figura 4**), è una forma di terapia che prevede l'estrazione di cellule staminali da midollo osseo, sangue periferico o da sangue del cordone ombelicale che vengono poi reinfuse per via endovenosa al destinatario.

Se le cellule trapiantate sono quelle del paziente stesso, il trapianto si definisce **autologo**.

Se le cellule provengono invece da un donatore, il trapianto si definisce **allogenico**.

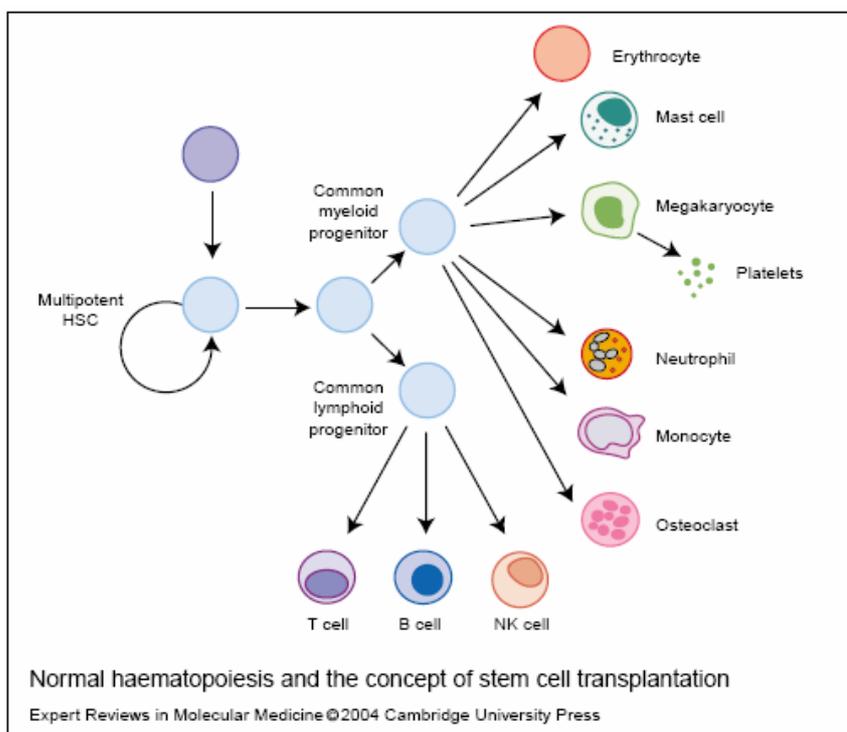


Figura 4. Normale emopoiesi e il concetto di trapianto di cellule staminali. Il midollo osseo è ricco di cellule staminali ematopoietiche (HSC) che hanno la capacità di differenziarsi in una varietà di linee cellulari. Le multipotenti HSCs possono diventare precursori linfocitari o mieloidi (comuni progenitori linfocitari e mieloidi, rispettivamente). La linea linfocitaria produce cellule T, cellule B e natural killer (NK). La linea mieloide produce eritrociti, mastociti, megacariociti, neutrofili e monociti, così come le cellule non direttamente associate al sistema ematopoietico, gli osteoclasti. La maggior parte dei pazienti con immunodeficienza grave combinata (SCID) hanno un blocco nel differenziamento della linea linfocitaria. Se è disponibile un donatore compatibile HLA-matched, le cellule staminali possono essere raccolte dal midollo osseo ('trapianto di midollo osseo'), o da sangue periferico dopo mobilizzazione delle HSCs dal midollo osseo utilizzando il fattore stimolante colonie del fattore di crescita dei granulociti ('trapianto di cellule staminali da sangue periferico'), e trapiantato al destinatario. L'attecchimento delle multipotenti HSCs consente la ricostituzione della cellula donatrice del sistema ematopoietico. Gaspar *et al.*, 2004

#### 4.1.1 Il regime di condizionamento

Per eradicare la malattia e creare lo spazio per le cellule da trapiantare all'interno della cavità midollare, i pazienti devono essere sottoposti ad una terapia intensiva con farmaci citotossici associati o meno a radioterapia chiamata "regime di condizionamento". Tale trattamento viene definito "sovramassimale" in quanto, a differenza delle chemioterapie convenzionali, distrugge l'emopoiesi del paziente in modo irreversibile, non consentendo quasi mai il recupero ematologico spontaneo. Si viene quindi a creare una situazione di aplasia, ovvero di assenza totale di parenchima midollare con conseguente pancitopenia periferica, cioè mancanza di globuli bianchi, eritrociti e piastrine nel sangue. Tramite il regime di condizionamento si perseguono due scopi fondamentali nella procedura trapiantologica: eliminare le cellule malate creando un ambiente favorevole alle cellule sane che verranno infuse; immunosopprimere, cioè annientare le difese immunitarie del paziente, in modo da consentire alle nuove cellule staminali di attecchire senza venire distrutte dal sistema immunitario. Tale aspetto è di fondamentale importanza per il trapianto allogenico.

A 24-48 ore dal termine del condizionamento le cellule staminali vengono infuse (o "reinfuse" se si tratta di un trapianto autologo) attraverso il catetere venoso centrale come una trasfusione di sangue. Le cellule staminali raggiungono così le cavità all'interno delle ossa, trovando le "nicchie" svuotate per effetto del condizionamento ed avendo così modo di attecchire e ricostituire un midollo osseo normale.

Alla reinfusione segue la **fase aplastica**, cioè la fase di scomparsa del midollo del paziente nell'attesa che le cellule staminali infuse riprendano le loro normali funzioni, iniziando a produrre globuli bianchi, globuli rossi e piastrine. In questa fase il paziente, essendo privo di difese immunitarie, cioè di globuli bianchi, è esposto ad un elevato rischio di complicanze infettive. Data anche la temporanea assenza di globuli rossi e piastrine, si rende necessario un supporto trasfusionale adeguato per correggere lo stato anemico e prevenire le emorragie. Per ridurre l'incidenza di infezioni si rende quindi indispensabile una terapia di profilassi antibatterica, antivirale e antifungina che inizia contemporaneamente alla chemioterapia di condizionamento e termina quando il paziente diventa immunocompetente, cioè quando le cellule del nuovo sistema immunitario acquisiscono la piena capacità di difesa dell'organismo dalle infezioni, in genere dopo due anni dal trapianto.

Nella **ricostituzione ematologica** il numero dei globuli bianchi usualmente risale dopo 10-20 giorni dall'infusione, raggiungendo valori di sicurezza entro due-tre settimane dal trapianto stesso. Per convenzione si definisce "attecchimento" il periodo in cui nel sangue periferico i granulociti neutrofili superano stabilmente il valore di 500/mmc e le piastrine di 25000/mmc, livelli ancora ridotti ma indicativi di ripresa midollare, in quanto la presenza di cellule mature nel sangue periferico riflette l'attività dei loro precursori nel midollo osseo.

#### 4.1.2. L'obiettivo terapeutico nel trapianto di midollo osseo allogenico

L'obiettivo terapeutico nel trapianto di midollo osseo allogenico, che consiste nella sostituzione del patrimonio staminale del paziente con l'infusione di cellule staminali ottenute da un donatore sano, si propone la guarigione del paziente. Questa dipende da tre fattori fondamentali:

1. **la scomparsa totale delle cellule staminali del ricevente**, perseguita, come detto, dal regime di condizionamento a dosi "sovramassimali";
2. **il superamento degli effetti tossici del regime di condizionamento stesso**, che, per l'alto dosaggio dei farmaci impiegati, può provocare nel paziente danni a vari organi e, abbattendone le difese immunitarie, esporlo ad alto rischio di infezioni;
3. **il superamento della doppia barriera immunologica**, che differenzia il trapianto di midollo osseo (TMO) da ogni altro tipo di trapianto. In un trapianto d'organo, per esempio nel trapianto di rene, le cellule immunocompetenti del ricevente possono "rigettare" l'organo trapiantato, riconoscendolo come estraneo. Nel caso del TMO allogenico, oltre al rischio del **rigetto** dovuto alle cellule immunocompetenti del ricevente, esiste anche il rischio della "Malattia del Trapianto contro l'Ospite", detta **GVHD** (Graft Versus Host Disease), dovuta alle cellule immunocompetenti del donatore che riconoscono come estraneo l'organismo del ricevente.

La guarigione del paziente dipende dalla reale scomparsa delle sue cellule midollari, ottenuta con il regime di condizionamento e dalla loro sostituzione da parte delle cellule staminali emopoietiche del donatore. Il ricevente presenta pertanto due sistemi cellulari diversi: le cellule del midollo osseo derivano dal donatore, mentre tutte le altre cellule dei tessuti dell'organismo ovviamente appartengono al ricevente. E' in questo senso che si viene a creare una "**chimera**", termine mutuato dalla mitologia classica che definiva creature composte da parti anatomiche appartenenti ad animali diversi.

Nell'eseguire **un trapianto** di cellule staminali allogeniche è necessario individuare **un donatore** di midollo osseo idoneo, il che significa tipizzare sia donatore che ricevente, ovvero verificare, con tecniche di biologia molecolare, che le cellule dell'uno e dell'altro siano HLA compatibili e presentino quindi gli stessi antigeni di istocompatibilità.

I geni che determinano la compatibilità tissutale sono raggruppati in un complesso cromosomico che prende il nome di complesso maggiore di istocompatibilità, nell'uomo siglato HLA, "human leukocyte antigen", localizzato sul braccio corto del cromosoma 6. I prodotti dei geni HLA, conosciuti come "antigeni HLA", sono espressi sulla superficie delle cellule. Grazie a tali antigeni i linfociti di ogni individuo "tollerano" le cellule del proprio organismo, mentre riconoscono come estranee le cellule che portano antigeni HLA diversi, cioè provenienti da un

individuo diverso, e si attivano contro di esse provocando reazioni citotossiche. Di conseguenza è evidente come pre-requisito di fondamentale importanza per il successo del trapianto allogenico sia che ricevente e donatore abbiano un sistema HLA il più possibile simile, in modo da limitare il rischio di **rigetto** da una parte (i linfociti del paziente distruggono le cellule del donatore) e di GVHD (i linfociti del donatore colpiscono i tessuti del ricevente provocando una reazione sistemica). I geni del sistema HLA hanno la caratteristica di essere estremamente variabili da individuo ad individuo. Tale variabilità è ristretta tra i consanguinei, dove ogni fratello ha una probabilità del 25% di essere HLA compatibile col paziente, mentre è molto elevata al di fuori dell'ambito familiare. Per dare la possibilità di trovare un donatore anche a quei pazienti che non possiedono un donatore familiare compatibile sono state create le "banche" di midollo osseo, contenenti i risultati della tipizzazione HLA di milioni di donatori volontari, e le "banche" di sangue di cordone ombelicale.

Il TMO si definisce così anche sulla base del tipo di **donatore**:

- Il trapianto singenico
- Il trapianto di midollo osseo allogenico da donatore familiare
- Il trapianto di cellule staminali periferiche allogeniche da donatore familiare
- Il trapianto di midollo osseo allogenico da donatore volontario non familiare
- Il trapianto di cellule staminali da donatore aploidentico (TMO aploidentico)
- Il trapianto di cellule staminali emopoietiche da sangue di cordone ombelicale (SCO)

#### *4.1.2.1. Il trapianto singenico*

Viene effettuato tra fratelli gemelli mono-ovulari, cioè geneticamente identici. In questo caso, essendoci una assoluta identità del sistema HLA tra donatore e ricevente, non vi è rischio di **GVHD**. Non è necessario il trattamento immunosoppressivo post-trapianto, ma aumenta la probabilità di ritorno della malattia (soprattutto se neoplastica) in quanto viene a mancare quell'effetto detto GVL (graft versus leukemia), esercitato dai linfociti del donatore contro le eventuali cellule malate residue del ricevente.

#### *4.1.2.2. Il trapianto di midollo osseo allogenico da donatore familiare (HLA matched sibling o related donor)*

Il donatore, in genere una sorella o un fratello risultato HLA compatibile, viene sottoposto ad uno screening pre-trapianto che rispetta le regole di quello del donatore di sangue per i Centri Trasfusionali.

#### *4.1.2.3. Il trapianto di cellule staminali periferiche allogeniche da donatore familiare*

Negli ultimi anni è diventato sempre più frequente l'impiego di cellule staminali prelevate da sangue periferico, tanto che in alcuni Centri tale procedura, consentendo di ottenere un numero più elevato di cellule, viene regolarmente effettuata in sostituzione di quella del prelievo di midollo osseo. In questo caso il donatore familiare viene sottoposto al prelievo di cellule staminali periferiche tramite aferesi dopo stimolazione con fattore di crescita (sostanza in grado di aumentare la quota di cellule staminali in periferia), senza necessità di alcun tipo di anestesia.

#### *4.1.2.4. Il trapianto di midollo osseo allogenico da donatore volontario non familiare (HLA matched unrelated donor o MUD)*

In assenza di un donatore HLA identico tra i consanguinei può essere attivata una ricerca informatizzata nei vari Registri Internazionali, che contengono i dati della tipizzazione HLA di milioni di donatori volontari, le cosiddette “banche” di midollo osseo.

#### *4.1.2.5. Il trapianto di cellule staminali da donatore aploidentico (TMO aploidentico o partially matched related donor)*

La compatibilità HLA è un fattore fondamentale e limitante per i trapianti di midollo osseo allogenico. Solo il 30-35% dei pazienti possiede un donatore familiare HLA-identico (un fratello o una sorella), e, sebbene per il 40% dei pazienti sia possibile individuare un donatore volontario da banca, per molti altri questa evenienza è ancora difficoltosa, spesso impossibile. Il trapianto da donatore parzialmente HLA identico consente di estendere il TMO allogenico anche a quei pazienti che non dispongono né di un donatore familiare né di un donatore volontario da registro HLA-identici. Il donatore aploidentico o parzialmente identico, infatti, può essere un consanguineo (genitore, figlio, fratello, cugino) che può non essere HLA-identico a livello molecolare, ma condividere alcuni, ma non tutti, HLA sulla superficie delle cellule, cioè lo stesso aplotipo. La fattibilità e la sicurezza di questo tipo di trapianto è limitata da un'alta incidenza di **GVHD**. Per limitare questo rischio, si possono infondere al ricevente sospensioni di cellule staminali T-deplete, ovvero depurate dai linfociti T, che sono i principali responsabili della reazione GVHD.

#### *4.1.2.6. Il trapianto di cellule staminali emopoietiche da sangue di cordone ombelicale (SCO)*

Può essere utilizzato per un trapianto HLA matched o HLA partially matched.

L'impiego delle cellule staminali da sangue di cordone ombelicale nel trapianto allogenico è stato suggerito da alcune caratteristiche biologiche di tali cellule. Tra queste: la loro immaturità,

che riduce il rischio della **GVHD** e la loro alta capacità di proliferare, maggiore rispetto a quella del midollo osseo e del sangue periferico dell'adulto.

Per rispondere all'esigenza di circa il 40% di pazienti che non trova un donatore compatibile né nell'ambito familiare, né nei Registri Internazionali di donatori volontari di midollo osseo, negli ultimi anni sono state create banche di SCO. La realizzazione di queste banche è stata possibile grazie alla generosità di madri che donano il proprio cordone ombelicale al momento del parto. Va sottolineato che la procedura di donazione è tecnicamente semplice e non rischiosa né per la madre né per il bambino. Il sangue contenuto nel cordone ombelicale, infatti, può essere facilmente prelevato dopo l'espletamento del parto sia spontaneo sia cesareo. Su ogni unità SCO viene eseguito lo studio HLA, il cui risultato viene inserito nel Registro Internazionale della "banca di SCO". L'unità viene poi congelata e resa disponibile nel caso venga individuato un paziente compatibile, a cui verrà quindi destinata.

#### **4.1.3. Le nuove acquisizioni del trapianto con condizionamento non mieloablativo.**

Il TMO allogenico con condizionamento standard, volto cioè alla totale eradicazione dell'emopoiesi del paziente, ha come limite l'elevata tossicità responsabile dell'alta percentuale di mortalità correlata al trapianto, valutabile in circa il 20-30%.

**Il TMO allogenico con condizionamento non mieloablativo** consiste in una procedura che utilizza farmaci meno potenti o a dosi ridotte in modo da ridurre la morbilità e soprattutto la mortalità nei primi 100 giorni post-trapianto. Questo rende possibile l'applicazione del TMO allogenico anche a quei pazienti pesantemente trattati per la loro malattia, in cattive condizioni cliniche o troppo anziani. Se da una parte la riduzione dell'intensità dei protocolli di condizionamento permette di ottenere una più bassa mortalità correlata al trapianto, dall'altra, non eradicando completamente l'emopoiesi del ricevente, è gravata da un alto tasso di recidiva di malattia. Per tale motivo sono state elaborate diverse procedure di immunomodulazione volte ad eliminare la quota residua del midollo del ricevente nella fase post-trapianto tramite la sospensione precoce della terapia immunosoppressiva (in genere con ciclosporina) seguita o meno dall'infusione dei linfociti del donatore. Tali manovre terapeutiche hanno lo scopo di indurre l'effetto GVL (graft versus leukemia), ovvero la reazione dei linfociti del donatore contro le cellule malate residue del ricevente. Brillanti risultati sono stati ottenuti nel trattamento di alcuni linfomi, della leucemia mieloide cronica, e, più recentemente, del mieloma multiplo, con una modesta mortalità correlata al trapianto e una bassa incidenza di complicanze, risultati incoraggianti considerando la tipologia dei pazienti sottoposti a tale procedura (anziani, pluritrattati). Pertanto il TMO allogenico con condizionamento non mieloablativo potrebbe rappresentare un reale progresso nel campo del trapianto allogenico se i risultati finora disponibili saranno confermati.

Negli ultimi anni sono stati condotti due importanti studi sull'uso di HSCT per trattare le SCID. Il primo descrive procedimenti di HSCT senza condizionamento chemioterapico eseguito su 89 pazienti tra il 1982 e il 1998 presso uno dei principali centri del Nord America (**Tabella 3**). Di questi, 77 ricevettero il midollo dei genitori HLA-aploidentico depleto di cellule T e 12 ricevettero il midollo HLA-identico da un donatore compatibile.

VARIABLE	No. OF PATIENTS	No. SURVIVING	PERCENT SURVIVING	P VALUE*	
				WILCOXON	LOG RANK
Type of severe combined immuno-deficiency				NS	NS
$\gamma$ -Chain deficiency	43	34	79		
JAK3 deficiency	6	6	100		
Interleukin-7 receptor $\alpha$ deficiency	2	2	100		
Adenosine deaminase deficiency	13	11	85		
Autosomal recessive, unknown cause	20	17	85		
Cartilage-hair hypoplasia	1	1	100		
Male, unknown	4	1	25		
Total	89	72	81		
Race or ethnic				<0.001	<0.001
White	69	61	88		
Black	10	5	50		
Hispanic	10	6	60		
Total	89	72	81		
Sex				0.047	0.06
Male	75	58	77		
Female	14	14	100		
Total	89	72	81		
Age at time of transplantation				0.088	NS
<3.5 mo	22	21	95		
$\geq$ 3.5 mo	67	51	76		
Total	89	72	81		

\*NS denotes not significant.

**Tabella 3.** Cifre di sopravvivenza di 89 pazienti con immunodeficienza combinata grave che hanno ricevuto trapianti tra maggio 1982 ed agosto 1998. Buckley, R.H. *et al.* (1999)

Tre dei destinatari del midollo aploidentico avevano anche ricevuto il trapianto di sangue placentare da donatori non compatibili. Fatta eccezione per due pazienti che avevano ricevuto sangue placentare, nessuno dei destinatari era stato trattato con chemioterapia prima del trapianto o aveva ricevuto profilassi contro GVHD. Degli 89 bambini, 72 (81%) erano ancora vivi da 3 mesi a 16 anni e mezzo dopo il trapianto, compresi tutti i 12 bambini che avevano ricevuto il midollo HLA-identico, i 60 dei 77 (78%) che avevano ricevuto il midollo aploidentico, e i 2 dei 3 (67%) che avevano ricevuto sia il midollo aploidentico che il sangue placentare (**Figura 5**). La funzione delle cellule T diventava normale entro due settimane dopo il trapianto nei pazienti che ricevevano un midollo non frazionato HLA-identico, ma di solito non prima di tre o quattro mesi dopo il trapianto in coloro che avevano ricevuto il midollo depleto di cellule T. Al momento della valutazione più recente, solo 4 dei 72 sopravvissuti

avevano ripreso una normale funzione delle cellule T, e tutte le cellule T nel sangue erano originate da un donatore. La funzione delle cellule B rimaneva anormale in molti dei destinatari del midollo aploidentico. In 26 bambini (5 destinatari di midollo HLA-identico e 21 destinatari di midollo aploidentico) tra il 2% e il 100% delle cellule B erano originarie da un donatore. Quarantacinque dei 72 bambini avrebbero ricevuto immunoglobuline per via endovenosa. Il trapianto di midollo da un donatore compatibile è un trattamento salvavita ed è salvavita per i pazienti con qualsiasi tipo di SCID, anche quando non vi è un donatore HLA-identico (**Buckley R.H. et al., 1999**).

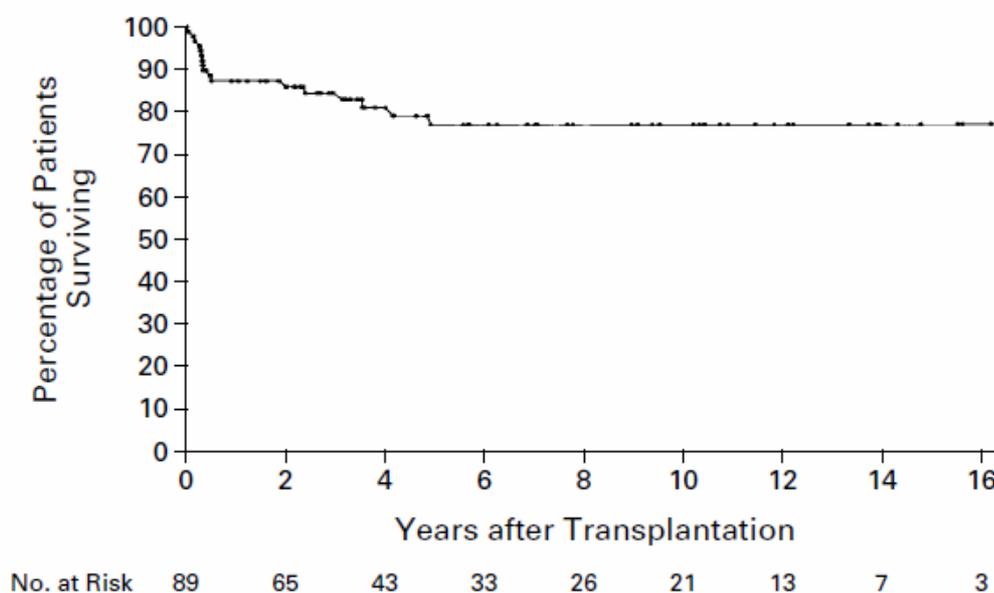


Figura 5. Curva di sopravvivenza Kaplan-Meier per 89 pazienti con immunodeficienza grave combinata che avevano ricevuto trapianti di cellule staminali. 81% dei pazienti era sopravvissuto alla più recente evoluzione; soltanto 12 ricevettero trapianti da identici donatori compatibili. Gaspar *et al.*, 2009

Il secondo studio ha valutato i risultati a lungo termine di procedimenti condotti tra il 1968 e il 1999 (**Antoine C. et al., 2003**) e includeva i dati provenienti da 37 centri di 18 Paesi, che parteciparono ad un registro europeo per il trapianto di cellule staminali nelle SCID e in altri disordini non-SCID. Vennero studiati 1082 trapianti in 919 pazienti (566 in 475 pazienti SCID, e 512 in 444 pazienti non-SCID).

Negli individui affetti da SCID, la sopravvivenza a 3 anni fu del 77% dopo il trapianto HLA-identico e del 54% in seguito a trapianto mismatched con un miglioramento della sopravvivenza nel tempo. Nel trapianto di cellule staminali HLA-mismatched, B (-) SCID avevano una prognosi peggiore di B (+) SCID. Tuttavia, un miglioramento nel tempo si era verificato in entrambi i fenotipi SCID. Nei non-SCID, la sopravvivenza a 3 anni dopo un trapianto genotipicamente HLA-matched, fenotipicamente HLA-matched, HLA-mismatched correlato, e

un trapianto da donatore non correlato era del 71%, 42%, 42% e il 59%, rispettivamente. **(Figura 6)**. La GVHD correlava con una prognosi infausta qualunque fosse il donatore di origine ad eccezione del trapianto correlato HLA-identico nelle SCID.

Il miglioramento della sopravvivenza nel tempo indica una prevenzione più efficace e un trattamento delle complicazioni correlate alla malattia e ai procedimenti, ad esempio, infezioni e GVHD. Un fattore importante è migliorare la prevenzione della GVHD nel setting di HLA-non-identici con l'uso di metodi più efficaci della deplezione delle cellule T. Per i non-SCID, il trapianto di cellule staminali può fornire una cura, e i trapianti da donatori non correlati sono quasi benefici come quelli da parenti geneticamente HLA-identici.

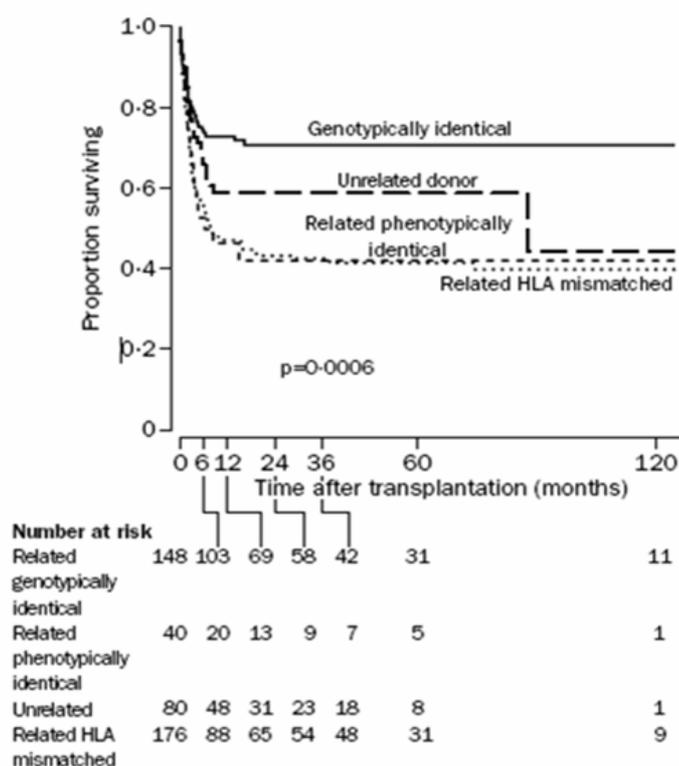


Figura 6. Probabilità cumulativa di sopravvivenza in pazienti non-SCID, secondo le fonti da donatore (donatore correlato o non correlato) e HLA compatibili. Gaspar *et al.*, 2009

Ci sono stati notevoli miglioramenti negli ultimi anni, con cifre di sopravvivenza del 80-90% tra il 1996 e il 1999. Per prima la chemioterapia mieloablativa si dimostrò benefica per un sottogruppo di soggetti, in particolare quelli con un fenotipo T-B-NK+. Per alcune condizioni invece, come nel deficit di ADA, lo studio ha mostrato percentuali di sopravvivenza di appena il 29% in trapianti HLA-mismatched (Waseem Q.H. *et al.*, 2004).

Questi dati non rappresentano comunque in modo efficace l'uso di trapianti da donatori non correlati e soprattutto non affrontano vari aspetti quali il condizionamento, se reso necessario

dalla malattia, il grado di ricostituzione immunitaria e di chimerismo secondo le diverse procedure di trapianto. Vi è anche una percezione da parte dei medici secondo cui i pazienti affetti da SCID-ADA sono più difficili da trapiantare di altri pazienti con SCID e che questi pazienti sono più vulnerabili al condizionamento o all'infezione forse a causa del difetto metabolico di base (Gaspar H.B. *et al.*, 2010).

Per queste ragioni, è stato avviato uno studio retrospettivo per raccogliere dati sull'esito del trapianto per pazienti affetti da SCID-ADA. I primi risultati dello studio sono stati presentati al Consiglio Europeo di Trapianto di Sangue e Midollo osseo ad Amburgo (2006) (Antoine C. *et al.*, 2003). Analisi seguenti sono state presentate al Consiglio Europeo di Trapianto di Sangue e Midollo osseo nel 2009 a Goteborg evidenziando i dati di un totale di 87 pazienti sottoposti a 97 procedimenti di trapianto reclutati dal centro europeo e Nord Americano, e il risultato di sopravvivenza è presentato in **Figura 7**.

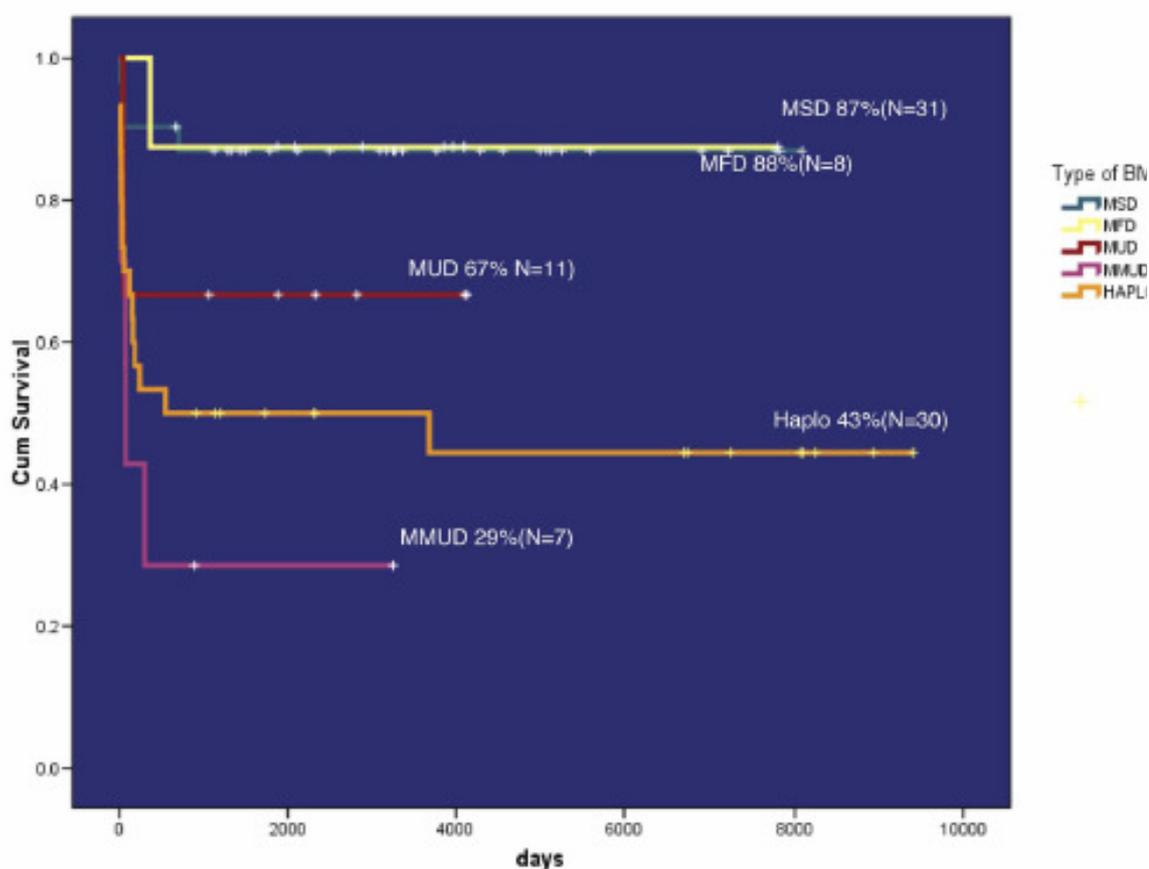


Figura 7. Sopravvivenza di pazienti che hanno ricevuto HSCT per SCID-ADA (primi risultati da uno studio retrospettivo internazionale multicentrico). Gaspar *et al.*, 2009

I maggiori risultati riportavano che trapianti da donatori matched (n = 31) fratello e da donatori matched (n = 8) avevano avuto un grande successo, con cifre di 3 anni di sopravvivenza dell' 87% e 88%, rispettivamente. Cifre di sopravvivenza (n = 11) di trapianti da donatore matched non correlato sono state del 67%. Cifre molto più basse sono state ottenute invece da trapianti da donatore mismatched correlato (n = 30) (da donatori parentali aploidentici) in cui la sopravvivenza era solo del 43%. Analogamente, la sopravvivenza a seguito di trapianti mismatched non correlati è stata allo stesso modo solo del 29% (n = 7). Le ragioni per questi risultati sono difficili da individuare, ma i fattori più determinanti sembrano essere la disparità di HLA e l'uso di condizionamento. La disponibilità di un donatore pienamente matched correlato consente l'infusione del trapianto da un donatore senza la necessità di qualsiasi precedente regime di condizionamento **citoriduttivo**. La maggioranza dei trapianti nel contesto matched fratello e donatore matched familiare sono stati eseguiti senza condizionamento e quindi sono state evitate tossicità relative alla chemioterapia a cui questi pazienti erano aneddoticamente vulnerabili. Per altre opzioni di donatori per i quali i risultati sono meno buoni, l'uso del condizionamento può aver giocato un ruolo importante. Si può sostenere che, data la ridotta immunità in pazienti SCID-ADA, è possibile eseguire tutti i trapianti senza l'uso di condizionamento anche in ambito dei non correlati e aploidentici. Tuttavia, i dati disponibili non supportano ciò. Dei 4 trapianti da donatori non correlati eseguiti senza condizionamento, 2 non attecchivano in modo efficace. I dati sono disponibili anche per i trapianti aploidentici SCID-ADA eseguiti senza condizionamento (**Booth C. et al., 2006**).

Delle 19 procedure eseguite nella singola Istituzione del Nord America, 14 pazienti sopravvissero alla procedura (73%), ma solo 7 furono trapiantati con successo (sopravvivenza libera da malattia del 37%) con il resto che rigettava il trapianto incondizionato. Questi dati suggeriscono che i trapianti non condizionati possono essere intrapresi con successo con i donatori pienamente matched fratello e donatori matched famiglia, ma vi è la necessità di condizionamento citoriduttivo per tutti gli altri tipi di donatori. Sono stati esaminati altri fattori determinanti. La suscettibilità percepita degli SCID-ADA al condizionamento ha portato al suggerimento che i pazienti possono beneficiare di procedure di ridotta intensità ma è interessante notare, che non vi era alcuna differenza tra i pazienti in fase di condizionamento ad intensità ridotta (n = 8, 50% di sopravvivenza) e quelli sottoposti pienamente al condizionamento mieloablativo (n = 38, 50% di sopravvivenza).

Un importante risultato è stato la qualità del recupero immunitario. I dati disponibili suggeriscono che la maggior parte dei pazienti che sopravvivono al trapianto normalizzano in maniera assoluta la conta dei linfociti e delle cellule T. Sorprendentemente, il 92% dei pazienti sono stati in grado di interrompere la terapia sostitutiva delle immunoglobuline, includendo 24

di 26 pazienti sottoposti a procedure da donatore fratello incondizionato, e suggerendo che il recupero dell'immunità è relativamente completo nella maggior parte dei pazienti sopravvissuti. Analogamente, i pazienti sono ben disintossicati dopo il trapianto con notevole riduzione dei livelli di dATP per una media di circa 100 mmol/l che, sebbene non normale, rappresenta approssimativamente 1 riduzione logaritmica dai livelli al momento della diagnosi (**Gaspar H.B. et al., 2010**).

Non erano disponibili dati sul grado di chimerismo del donatore. Secondo l'esperienza dell'autore Gaspar nelle procedure seguenti incondizionate, la maggior parte dei pazienti mostra solo un attecchimento delle cellule T del donatore, che può essere completa o mista. Tuttavia, c'è un po' di attecchimento delle cellule del donatore nelle linee mieloidi o cellule B. Altri dati provenienti da esperimenti su animali suggeriscono che nei trapianti neonatali di topo in topi con deficit di ADA, l'attecchimento di cellule piene di ADA negli organi non linfoidi come il fegato o nelle cellule mieloidi possono portare a una cross-correzione e allo sviluppo endogeno delle cellule T (**Carbonaro D.A. et al., 2008**). La conclusione di queste diverse osservazioni è che non è necessariamente importante l'attecchimento delle cellule del donatore in ogni specifica linea quanto, come accennato in precedenza, il rilascio sufficiente dell'enzima ADA in una fonte cellulare di attecchimento che permetta una disintossicazione sistemica efficace promuovendo in tal modo lo sviluppo delle cellule T e B.

Una questione importante per questa malattia è stato l'effetto del trapianto sulle altre manifestazioni della SCID-ADA. Il follow-up dei pazienti trapiantati dimostra che nonostante un recupero immunitario efficace e una detossificazione stabile, la maggioranza dei pazienti mostra deficit cognitivi, con una media del quoziente d'intelligenza IQ di 2 deviazioni standard al di sotto del range normale della popolazione, e mostra anche iperattività e patterns di deficit di attenzione degli squilibri comportamentali (**Titman P. et al., 2008**). I pazienti mostrano anche un'alta incidenza di problemi audiologici, con un pattern tipico di perdita dell'udito ad alte frequenze neurosensoriali. Per entrambi i tipi di difetti, non è stato possibile fare una correlazione con il tipo di trapianto o con il regime di condizionamento, o il grado di chimerismo, disintossicazione metabolica, o recupero immunitario. L'unica variabile che influenza il risultato era il livello di dATP al momento della diagnosi, che mostrava una correlazione negativa con il livello IQ, suggerendo che un maggiore equilibrio metabolico al momento della diagnosi portava a uno scarso IQ (**Rogers M.H. et al., 2001**). Tale risultato suggerisce che una certa quantità di danni può essere presente alla nascita, che sono irreversibili, nonostante la ricostituzione immunitaria e metabolica, che possono riguardare dal danno in utero allo sviluppo del feto e che possono riguardare i precedenti interventi terapeutici.

Questi dati forniscono alcune indicazioni utili per l'uso del trapianto secondo diverse opzioni di donatori. I risultati dal donatore matched fratello e i donatori matched correlati sono estremamente buoni e simili a quelli osservati per altre forme di SCID. La capacità di intraprendere queste procedure senza chemioterapia ed evitare così le tossicità relative alla chemioterapia a lungo e breve termine la rende un'opzione molto interessante, così come la qualità documentata della ricostituzione immunitaria cellulare e umorale. Al contrario, i trapianti da donatori mismatched non corrispondenti in particolare dai donatori parentali sono scarsamente tollerati e presentano scarsi dati di sopravvivenza. Questi trapianti sono anche non riusciti senza alcun condizionamento, con un alto tasso di rifiuto, e pertanto sarebbe opportuno evitare del tutto tali procedure, dato che altre opzioni di trattamento come ad esempio l'ERT e la terapia genica sono disponibili. I trapianti da donatori MUD erano ancora scarsamente rappresentati in queste serie, con solo 11 procedimenti pienamente matched eseguiti e un tasso di sopravvivenza globale del 67%; è difficile fare qualsiasi ferma raccomandazione sulla base di questi piccoli numeri. La capacità di evitare le complicazioni non immunologiche non è influenzato dal tipo di trapianto o il grado di condizionamento, ed è attualmente non possibile raccomandare le misure specifiche (**Gaspar H.B. et al., 2010**).

I dati sull'esito di HSCT possono aiutare a guidare il processo decisionale sulle strategie di trapianto da eseguire. Certamente, un trapianto da un fratello HLA-matched o da un donatore completamente familiare è associato ad un notevole successo in termini sia di sopravvivenza che di un recupero immunitario sostenuto e sarebbe il trattamento definitivo di scelta. Al contrario, l'evidenza attuale suggerisce che i trapianti da donatore aploidentico, intrapresi con o senza condizionamento, hanno poche possibilità di successo e nel setting condizionato sono associati con un alto grado di mortalità. Quindi, potremmo sostenere che i trapianti aploidentici dovrebbero essere intrapresi solo se non sono disponibili altre opzioni terapeutiche. Attualmente, i dati provenienti da donatori matched unrelated (67% di sopravvivenza in solo 11 pazienti nell'esperienza europea) non forniscono prove conclusive a favore o contro questo approccio a causa del basso numero di pazienti trattati e devono essere aggiunti ai dati provenienti da altre opzioni di trattamento (**Gaspar H. B., 2009**).

## 4.2. La terapia sostitutiva enzimatica (enzyme replacement therapy – ERT)

La seconda opzione terapeutica per la cura della SCID-ADA consiste nella terapia enzimatica sostitutiva o ERT. La terapia enzimatica sostitutiva che utilizzava trasfusione di scambio parziale con normali eritrociti irradiati non è più utilizzata ed è stata sostituita dallo sviluppo di pegilato ADA bovina.

L'ERT con PEG-ADA (*polyethylene-glycol-modified calf intestinal ADA*; ADAGEN® ottenuto fuori degli Stati Uniti attraverso la Orphan Europe) per il trattamento del deficit di ADA è stato disponibile per quasi 20 anni ed è stato designato un farmaco orfano. L'uso di PEG-ADA fornisce un'altra modalità di trattamento per la SCID-ADA, ma a differenza dell'HSCT o della terapia genica non è una terapia risolutiva ma richiede regolare somministrazione intramuscolare. Tuttavia, l'efficacia di PEG-ADA nella correzione dei parametri metabolici e immunologici e, cosa più importante, nel promuovere il benessere clinico nei pazienti la rende un'opzione importante nella cura dei pazienti.

Il PEG-ADA è un composto in cui la forma bovina di ADA è covalentemente coniugato a PEG. La pegilazione conferisce parecchie proprietà benefiche da un punto di vista terapeutico all'ADA attraverso l'alterazione delle sue proprietà fisiche e chimiche, principalmente dovuto ad un aumento del peso molecolare (Abuchowski A. *et al.*, 1977; Davis S. *et al.*, 1981). La circolazione in vita del composto si prolunga così da minuti a giorni e viene misurata come clearance del suo rallentamento in circolo (Abuchowski A. *et al.*, 1977).

Il PEG-ADA è somministrato con iniezioni intramuscolari da una a due volte a settimana, e si traduce in alti livelli di attività ADA nel plasma. Fatto importante è che la PEG-ADA non può attraversare la membrana cellulare e quindi esercita il suo effetto attraverso l'attività extracellulare dell'ADA. L'alta attività di ADA nel plasma elimina Ado e dAdo e, a causa dell'equilibrio mantenuto tra i compartimenti intra ed extracellulare, si verifica il movimento di Ado e dAdo nel compartimento extracellulare dove avviene un'ulteriore deaminazione. Il sottrarre l'adenosina dalla cellula riduce quindi l'accumulo intracellulare di dATP e provoca conseguenti effetti tossici. Da quando sono stati trattati i primi pazienti, il regime di dosaggio si è evoluto ed ora si consiglia che i bambini inizino con una dose di 60 U / kg / settimana con iniezioni bisettimanali fino a quando la correzione metabolica non si è stabilizzata (tra 1 e 3 mesi). Una volta che i pazienti mostrano miglioramento clinico e stabilizzazione biochimica, essi possono essere mantenuti con una dose di 30 U / kg / settimana con una singola iniezione settimanale (Hershfield M.S. *et al.*, 1993; Hershfield M.S. *et al.*, 1995).

Nel monitoraggio dei pazienti è importante valutare la loro funzione immunitaria e i loro parametri metabolici, soprattutto quando si considera di cambiare la dose di PEG-ADA. I livelli di dATP negli eritrociti possono anche essere misurati e usati per guidare il trattamento. Gli

iniziali livelli plasmatici di ADA (prima dell'iniezione) dovrebbero essere mantenuti da 50 fino a 150  $\mu\text{mol} / \text{h} / \text{ml}$  (valore normale  $<0,4 \text{ mmol} / \text{h} / \text{ml}$ ), il che equivale da circa 4 a 10 volte la normale attività di ADA negli eritrociti ed è necessario per una rapida prima disintossicazione. Una volta che si è stabilita una dose di mantenimento di 30 U / kg / settimana, i livelli plasmatici di ADA possono essere mantenuti da 25 a 60  $\mu\text{mol} / \text{h} / \text{ml}$ . I livelli della deossiadenosina negli eritrociti diminuisce in modo significativo, e vengono mantenuti a livelli al di sotto di quelli osservati dopo che l'attività di HSCT e SAHH si è normalizzata. Si raccomanda di monitorare i livelli di attività dell'ADA nel plasma ogni 1 o 2 settimane durante i primi 2 o 3 mesi di trattamento, due volte al mese fino a 9 mesi di trattamento, e quindi mensilmente fino a 18-24 mesi di PEG-ADA. Una volta che i pazienti si sono stabilizzati con una dose di mantenimento efficace, i livelli plasmatici di ADA possono essere misurati ogni 2-4 mesi a meno che non ci sia una variazione dello stato clinico.

Il PEG-ADA è stato usato come terapia iniziale per i pazienti che mancavano di un donatore di cellule staminali/midollo osseo HLA-identico e nelle situazioni in cui la valutazione dei rischi e dei benefici aveva favorito l'ERT rispetto ad altre opzioni (**Booth C. et al., 2006; Hershfield M.S. et al., 2004**). Spesso, i pazienti sono stati considerati troppo instabili per sottoporsi al condizionamento per un immediato HSCT da HLA mismatched o per tollerare l'attesa della ricerca di un donatore matched non consanguineo o per la valutazione di un trial di terapia genica. Meno del 10% dei pazienti aveva ricevuto PEG-ADA come terapia secondaria dopo la mancanza di HSCT (soprattutto aploidentico eseguita senza condizionamento) o terapia genica. Complessivamente, il 70% dei pazienti trattati con PEG-ADA aveva SCID e iniziava l'ERT a meno di 1 anno di età (50% erano inferiori a 6 mesi). La metà dei pazienti rimanenti iniziava il trattamento da 1 a 3 anni di età, e l'altra metà da 3 a 34 anni di età. Molti di questi ultimi pazienti con esordio "delayed" o "late" avevano malattia polmonare o altre conseguenze della deficienza immunitaria cronica, che li ha resi "scarsi" candidati per HSCT parzialmente mismatched con condizionamento.

A partire da settembre 2008, 98 pazienti erano in trattamento con PEG-ADA, circa la metà del numero aveva cominciato l'ERT (**Figura 8**). Circa il 20% dei pazienti era deceduto durante la terapia, il resto aveva interrotto l'ERT per sottoporsi ad una procedura potenzialmente curativa (circa il 20% HSCT, circa l'8% di terapia genica). Più dei due terzi dei trapianti sono stati eseguiti entro un anno dall'inizio di PEG-ADA, non appena la condizione clinica si era stabilizzata e veniva identificato un donatore idoneo.

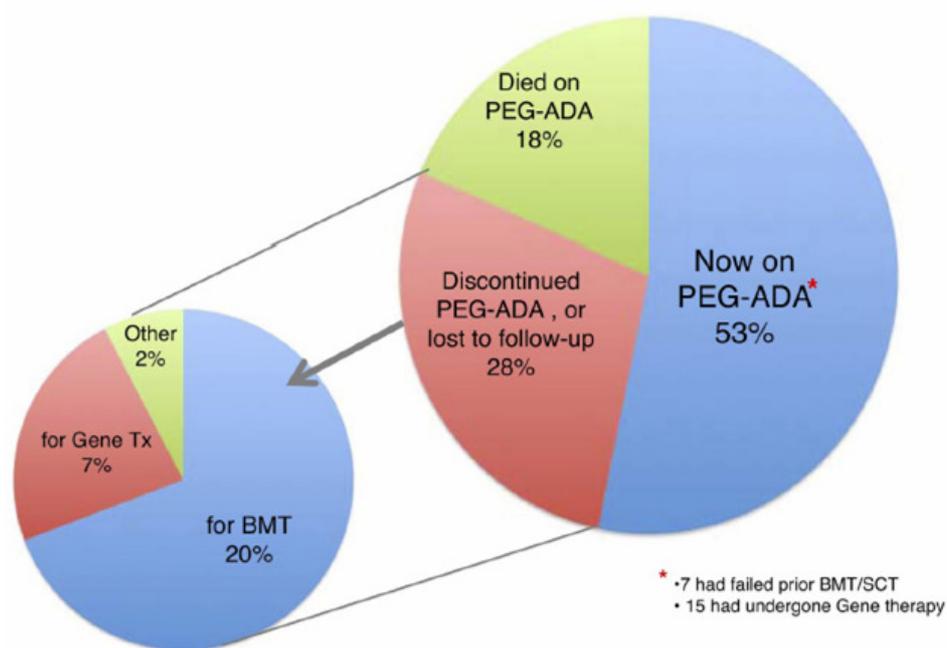
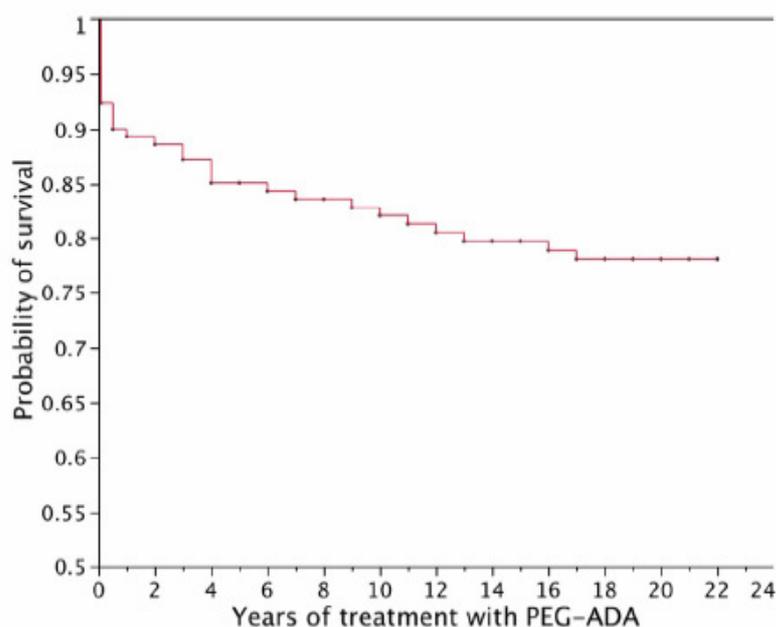


Figura 8. Destino di pazienti che avevano ricevuto l'ERT tra l'Aprile del 1986 e Settembre del 2008. Gaspar *et al.*, 2009

Durante il primo decennio dall'utilizzo di PEG-ADA la "Food and Drug Administration" ricevette l'approvazione nel 1990; la sopravvivenza dopo questi trapianti "elettivi" era stato di circa il 50% (Hershfield M.S. *et al.*, 2004), simile a quello per trapianti parzialmente mismatched in pazienti SCID-ADA che non avevano ricevuto l'ERT come prima terapia.

La **Figura 9** riporta la probabilità stimata di sopravvivenza rispetto alla durata del trattamento con PEG-ADA. La metà dei decessi in seguito all'ERT si sono verificati entro i primi 6 mesi (40% nel primo mese), derivanti da condizioni presenti al momento della diagnosi. La probabilità di sopravvivenza complessiva a 20 anni dal trattamento dell'ERT è stimato del 78%. Un paziente sopravvissuto 6 mesi dopo l'inizio dell'ERT ha avuto circa il 90% di probabilità di sopravvivenza nei 12 anni successivi. Condizioni che contribuiscono in modo significativo alla mortalità oltre i 6 mesi includono anemia emolitica refrattaria da 1 a 3 anni, insufficienza cronica polmonare dopo 5 fino ai 15 anni, e disordini linfoproliferativi dopo 5 fino a 15 anni di ERT (Kaufman D.A. *et al.*, 2005; Husain M. *et al.*, 2007).



**Figura 9.** Probabilità stimata di sopravvivenza durante il trattamento con ERT. I pazienti che avevano interrotto l'ERT per sottoporsi a trapianto di cellule staminali o terapia genica furono censurati al tempo in cui l'ERT fu fermata, ad eccezione di 5 pazienti che avevano sviluppato anemia emolitica refrattaria e, successivamente morì dopo il tentativo di trapianto di cellule staminali. In questi ultimi 5 casi, la morte fu attribuita all'ERT nel momento in cui veniva interrotto la PEG-ADA. Gaspar *et al.*, 2009

Sono stati identificati anticorpi neutralizzanti PEG-ADA, che inibivano direttamente l'attività catalitica e acceleravano la clearance dal plasma, in 9 pazienti (**Chaffee S. *et al.*, 1992; Lainka E. *et al.*, 2005**).

Sette di questi pazienti erano in grado di continuare l'ERT dopo il dosaggio "aggiustato" o dopo essere stati sottoposti con successo all'HSCT. Tuttavia, la perdita di efficacia contribuì alla morte di 4 pazienti, di cui 3 che avevano anche sviluppato anemia emolitica refrattaria.

In generale, l'ERT a lungo termine è stato ben tollerato e la maggior parte di questi i pazienti erano rimasti senza infezioni frequenti od opportunistiche.

In 2 recenti lavori sono stati documentati un graduale declino nella conta dei linfociti e varie anomalie nella funzione dei linfociti, tra cui l'output timico (**Malacarne F. *et al.*, 2005; Chan B. *et al.*, 2005**).

In sintesi, il trattamento con PEG-ADA offre spesso una terapia salva-vita al momento della diagnosi, quando altre opzioni non sono disponibili o la loro efficacia non è prevedibile. Se l'ERT viene prolungata oltre 6 mesi, vi è un'alta probabilità che i benefici clinici possano essere sostenuti per almeno un decennio. Tuttavia, il trattamento con PEG-ADA potrebbe non essere facilmente reperibile in alcuni Paesi. Il costo elevato del farmaco è inoltre un ostacolo per l'ERT a lungo termine; ed esistono ancora altre incertezze su come i benefici clinici e immunologici a lungo-termine possano essere mantenuti dopo 8-10 anni. Un ulteriore problema

nella pratica dell'ERT a lungo termine è la comparsa di gravi complicazioni, tra cui neoplasie di tipo linfoide ed eventualmente epatiche, e la progressione dell'insufficienza polmonare cronica.

### 4.3. La terapia genica con l'uso dei vettori retrovirali

Sin dalla scoperta della malattia, per SCID-ADA è stata ipotizzata la terapia genica con cellule ematopoietiche. In effetti i primi studi clinici di terapia genica per alcune malattie genetiche sono stati eseguiti su pazienti affetti da SCID-ADA nei primi anni 1990. Le ragioni che lo rendono un target ideale per la terapia genica includono (1) la sua natura monogenica, (2) il suo ruolo di enzima "housekeeping" con una configurazione semplice di regolazione genica, (3) il fatto che l'esperienza con HSCT dimostra che le manifestazioni più gravi della malattia possono essere corrette usando cellule ematopoietiche piene di ADA, e (4) i bassi risultati nei trapianti da donatori mismatched. I vantaggi della terapia genica rispetto al trapianto, validi ancora oggi, è che la modificazione di cellule autologhe evita le complicazioni di GVHD e a causa del vantaggio di sopravvivenza percepito per le cellule piene di ADA, la terapia genica può essere intrapresa con poca o nessun condizionamento (**Gaspar H.B., 2010**).

I primi studi di terapia genica per la SCID-ADA utilizzava diverse forme di vettori gammaretrovirali codificanti il gene ADA sotto il controllo trascrizionale delle lunghe ripetizioni terminali (long terminal repeat – LTR) virali (**Blaese R.M. et al., 1995; Bordignon C. et al., 1995; Kohn D.B. et al., 1995; Hoogerbrugge P.M. et al., 1996**).

Il target cellulare per i diversi studi variava da linfociti autologhi di sangue periferico (peripheral blood lymphocytes - PBLs), a una combinazione di midollo osseo e PBL, a cellule staminali CD34+ selezionate da midollo osseo o da SCO. In tutti questi studi, non è stato dato alcun condizionamento e tutti i pazienti avevano ricevuto PEG-ADA durante il trattamento con terapia genica. Da questi studi derivò che il trasferimento genico in popolazioni di cellule progenitrici poteva essere ottenuto nel corso del tempo e che non si sviluppava nessuna tossicità nei pazienti come risultato del trasferimento genico. Tuttavia, non è stato visto alcun miglioramento significativo in questi primi approcci.

#### 4.4 La terapia genica di HSC ingegnerizzate con vettori retrovirali

L'esperienza cumulativa delle prime sperimentazioni di terapia genica rilevarono la necessità di migliorare l'**efficienza** del trasferimento genico e favorire l'attecchimento a lunga durata del gene corretto con HSC. Inoltre il nuovo approccio per la cura della SCID-ADA prevedeva una riduzione degli svantaggi di terapie candidate o precedenti e la soluzione sia di problemi immunologici sia di quelli metabolici.

La svolta è arrivata nel 2000 e nel caso della SCID-ADA la terapia ha dato risultati molto promettenti ed è realmente indicata nei pazienti privi di donatore HLA-matched, come mostrato in particolare dalla casistica del gruppo di Alessandro Aiuti (**Gaspar H.B. et al., 2009**): è stata eseguita la terapia genica migliorando il protocollo di **trasduzione delle cellule CD34+** del midollo osseo da parte di un **vettore retrovirale derivato dal virus della leucemia murina (MLV) difettivo** e all'uso di un **condizionamento chemioterapico non-mieloablativo**. Inoltre, è stata utilizzata la sospensione della PEG-ADA per dare un vantaggio selettivo ai linfociti con il gene corretto. Il protocollo è stato eseguito in 15 pazienti di età dai 6 mesi a 5.6 anni. Tutti i 15 pazienti sono vivi (**Aiuti A. et al., 2009**). Nove di questi hanno buona ricostituzione T, 8 espressione di ADA persistente con “detossificazione sistemica” senza più necessità di PEG-ADA ad 8 anni dalla terapia genica, e 5 non hanno più necessità di trattamento con Ig.

Il progressivo ripristino delle funzioni immunitarie e metaboliche ha portato a notevoli miglioramenti nello sviluppo fisico dei pazienti e nella difesa da infezioni gravi, senza eventi avversi correlati alla terapia genica. In uno studio effettuato a Londra, vennero trattati 5 pazienti utilizzando un diverso vettore retrovirale alternativo e un regime di condizionamento a singola dose di **melfalano** (**Gaspar H.B. et al., 2006**). Due pazienti mostrarono un ottimo recupero immunitario e, nel terzo, coadiuvato con trattamento con PEG-ADA, le cellule trasdotte col gene contribuirono al recupero immunitario. Due pazienti invece non hanno dato buoni risultati: in un caso per scarsa raccolta di cellule staminali e nell'altro come basso livello di efficienza di trasduzione di cellule staminali. Nei 2 pazienti ricostituiti con maggior successo, l'espressione di ADA fu osservata in diverse linee ematopoietiche, comprese le cellule rosse del sangue, portando ad un'efficace disintossicazione metabolica. La grande maggioranza delle cellule T e cellule NK portavano il gene corretto. In queste 2 persone, dopo la terapia genica, fu anche notato una ripresa della timopoiesi.

La carenza di ADA rappresenta un approccio paradigmatico per gli approcci di terapia genica per disturbi ereditati per via ematica. I risultati degli studi clinici indicano che la terapia genica con condizionamento non-mieloablativo è associato a benefici clinici ed è ora un'opzione da considerare per tutti i pazienti SCID-ADA privi di un donatore fratello HLA-identico. I risultati

di recenti studi condotti a Milano, Londra, e gli Stati Uniti in cui almeno 20 pazienti sono stati seguiti per più di 1 anno sono sorprendenti sia per tossicità che efficacia. Tutti i pazienti sono sopravvissuti alla terapia, che si confronta favorevolmente con i dati HSCT, e la maggior parte dei pazienti ha un recupero totale o parziale del sistema immunitario. Rispetto alle manifestazioni non immunologiche, resta da stabilire se la terapia genica darà migliori risultati rispetto al trapianto allogenico nel prevenire le complicanze neuro-cognitive osservate frequentemente in questi bambini, dopo il trapianto (**Titman P. et al., 2008; Honig M. et al., 2007**).

È importante sottolineare che nessuno dei pazienti ha mostrato la proliferazione clonale o eventi avversi correlati al trasferimento genico, nonostante l'osservazione di integrazione di sequenze vettore in oncogeni noti. Questo può indicare che la terapia genica per la SCID-ADA ha un favorevole profilo rischio-beneficio.

#### 4.5. La terapia genica di HSC ingegnerizzate con vettori lentivirali

L'utilizzo di vettori lentivirali auto-inattivanti (self-inactivating-SIN) potrebbe fornire prestazioni e livelli di sicurezza superiore per la terapia genica della SCID-ADA (Montini E. *et al.*, 2009). I vettori lentivirali hanno suscitato notevole interesse per la loro capacità di trasdurre cellule non in divisione e soprattutto per la trasduzione altamente efficiente di cellule staminali. In termini di sicurezza, il profilo di integrazione di vettori lentivirali, anche se prevalentemente intragenico, non avviene a livello dei promotori di geni trascrizionalmente attivi come invece per i vettori retrovirali. I vettori SIN, oltre ad esprimere il transgene con un promotore eucariotico, presenta rischi di inattivazione genica e di oncogenicità significativamente ridotti rispetto ai vettori retrovirali.

In esperimenti comparativi di ceppi murini ad alto rischio di tumore, i vettori SIN-lentivirali hanno mostrato livelli di oncogenicità significativamente ridotta rispetto ai vettori retrovirali non SIN, questi ultimi simili a quelli utilizzati in precedenti protocolli di terapia genica per SCID-ADA (Montini E. *et al.*, 2009).

Lo sviluppo dei vettori per il deficit di ADA in modelli murini preclinici è avanzato quindi a grandi passi verso i vettori SIN-lentivirali. E' stata mostrata l'efficacia di un vettore SIN-lentivirale che esprime ADA sotto controllo del promotore della fosfoglicerato chinasi (Mortellaro A. *et al.*, 2006). Cellule di midollo osseo di topi mancanti di ADA furono trasdotte *ex vivo* e reinfuse per via endovenosa con conseguente disintossicazione metabolica, ripristino dell'attività dell'ADA, differenziazione e funzioni immunitarie delle cellule linfoidi, compresi la produzione di anticorpi antigene-specifici. In questi esperimenti, il condizionamento prima del trapianto è stato fondamentale per la sopravvivenza a lungo termine dei topi mancanti di ADA. Gli animali che ricevettero la terapia genica o il trapianto allogenico senza irradiazione morirono infatti per scarso attecchimento delle cellule ingegnerizzate.

Al contrario, Carbonaro *et al.* (2008) dimostrò che l'1-3% dell'attecchimento al donatore raggiunto senza un precedente condizionamento citoriduttivo fu sufficiente a salvare i topi appena nati. Dosi relativamente basse di irradiazioni corporee totali aumentarono i livelli di attecchimento in maniera significativa sottolineando che la SCID-ADA è unica nelle sue risposte al condizionamento non-mieloablativo. In un differente approccio, un vettore SIN lentivirale che esprime ADA con promotore/enhancer MND (un promoter sintetico che contiene la regione U3 di un LTR modificato MoMuLV - virus della leucemia murina di Moloney - con enhancer del virus del sarcoma mieloproliferativo) è stato usato per il trattamento neonatale di topi mancanti di ADA direttamente *in vivo* tramite iniezione endovena (Carbonaro D.A. *et al.*, 2006). Oltre alla sopravvivenza prolungata, i topi mostrarono in modo significativo un aumento del numero di cellule linfoidi e una ripresa della proliferazione delle cellule T dopo induzione di

mitogeni. Tuttavia, la somministrazione di vettori lentivirali *in vivo* ha causato minimi livelli di trasduzione HSC non conferendo quindi nessun vantaggio rispetto alla trasduzione *ex-vivo* che rimane al momento l'applicazione più promettente.

Una recente osservazione, espansione clonale di HSC ingegnerizzate e con vettore lentivirale integrato monoclonalmente vicino al gene della proteina DNA-binding HMGA2 in un paziente trattato per talassemia in Francia, ha imposto però ulteriori cautele nell'utilizzo di questi vettori **(Williams D.A., 2009)**.

## Cap. 5. La storia della terapia genica

La terapia genica può essere generalmente definita come il trattamento di una malattia mediante l'introduzione di geni terapeutici in appropriate cellule bersaglio. Questi geni terapeutici possono correggere conseguenze deleterie di specifiche mutazioni geniche o riprogrammare le funzioni cellulari per guarire da una malattia. Per una terapia genica di successo, un gene terapeutico esogeno deve essere specifico, efficiente, e stabilmente incorporato in una cellula bersaglio.

**Il concetto di terapia genica** non è affatto nuovo o recente ed è stato accompagnato da polemiche dal momento in cui è stato proposto. È pertanto opportuno affrontare questo argomento con una breve prospettiva storica. Come nel caso di molte rivoluzioni scientifiche, tutto è iniziato con una semplice domanda: come vengono tramandate le caratteristiche di generazione in generazione? Non può essere messo in discussione che, il lavoro svolto da Gregor Mendel durante il 1850 fino ai primi del 1860 e il lavoro successivo di Ronald Fisher nel corso del XX secolo, rappresentano punti di riferimento nel campo della genetica (**Weiling F. et al., 1991**). Il loro lavoro ha confermato che gli organismi contengono "informazioni codificate" in forma di qualche tipo di materiale biologico discreto, denominato "gene" nel 1909 dal botanico danese Wilhelm Johannsen (**Falk R. et al., 1984**). Nel corso del XX secolo divenne chiaro che molte condizioni umane mediche, come l'emofilia, venivano trasmesse dai genitori ai figli. Si è anche dimostrato che alcune malattie come il diabete, il retinoblastoma, e il cancro del colon, hanno dato alcuni contributi genetici di base. La correzione di questi difetti rappresentava una sfida medica perché non era possibile manipolare direttamente i geni (**Keeler C.E. et al., 1947**). Diverse scoperte nel campo della genetica, biochimica e biologia molecolare dal 1940 al 1980 cambiarono drasticamente questo punto di vista. In un periodo di tempo relativamente breve, il DNA venne identificato come il materiale genetico (**Avery O.T. et al., 1979**), venne risolta la sua struttura (**Watson e Crick 1953a, Watson e Crick 1953b**), venne decifrato il codice genetico (**Ochoa S. et al., 1963**), e la clonazione del gene divenne di routine (**Cline M.J., 1985; Hamer D.H. et al., 1979; Mantei N. et al., 1979; Mulligan R.C. et al., 1979; Nagata S. et al., 1980**).

**Entro la fine del 1970**, le basi molecolari di molti disturbi genetici vennero così ben compresi e la terapia genica fornì la soluzione "ideale e chiara" (**Friedmann T. et al., 1976**): ripristinare il gene per curare la malattia. La terapia genica non era più considerata un trattamento alternativo per le condizioni genetiche umane, ma una soluzione potenziale (**Friedmann T. et al., 1976; Friedmann e Roblin, 1972**). Infatti, il primo trial della terapia genetica umana è stata effettuato nei primi anni 1970. Tre pazienti iperargininemicici furono inoculati per via endovenosa con il papillomavirus Shope in modo che l'arginasi virus-codificato potesse correggere la malattia. In

realtà, la somministrazione endovenosa nei conigli fu asintomatica e terapeutica. Tuttavia, nessuna riduzione dei livelli ematici dell'arginina furono osservati nei pazienti trattati e gli autori attribuirono ciò alla marcata instabilità del virus (**Friedmann e Roblin, 1972; Terheggen H.G. et al., 1975**). In ogni caso, il rapido sviluppo scientifico portò improvvisamente la terapia genetica umana da uno scenario irrealistico ad una possibilità più vicina al futuro, aumentando le preoccupazioni di sensibilizzazione all'interno della comunità scientifica e non scientifica. Alcuni di questi problemi rimangono, come ad esempio la clonazione umana (**Neville R. et al., 1976**), essendo stati nuovamente risolti dai più recenti progressi nella clonazione somatica, nella biologia delle cellule staminali, e nella medicina rigenerativa.

Con la metà del **1980**, il trasferimento genico di cellule di mammifero venne eseguita di routine. In effetti, il trasferimento genico basato sui retrovirus presentò importanti vantaggi dovuti all'integrazione stabile dei loro genomi nei cromosomi della cellula ospite. Tuttavia, la terapia genica fu ancora controversa, in gran parte a causa del malcapito campo di regolazione genica, le preoccupazioni circa le possibili influenze di DNA esogeno nella cellula ospite, e ad altre importanti questioni etiche (**Williamson B., 1982**). Gran parte delle questioni etiche si materializzarono dopo il controverso trial di terapia genica umana non autorizzata effettuato nel 1980 in due pazienti con  $\beta$ -talassemia (**Cline M.J., 1985; Mercola e Cline, 1980**).

E' nel **1983** che un gruppo di scienziati del Texas, proposero, per la prima volta, la terapia genica come valido approccio per il trattamento della malattia di Lesch-Nyhan, una malattia neurologica rara.

Gli anni '90 hanno visto, spinti dai risultati incoraggianti ottenuti, un proliferare di ricerche e di sperimentazioni sulla terapia genica nell'uomo.

La prova principale del trasferimento genico di  $\gamma$ -retrovirus nelle cellule staminali emopoietiche è stata dimostrata nei primi anni del **1990** (**Brenner M.K. et al, 1993; Deisseroth A.B. et al., 1994; Dunbar C.E. et al., 1995; Rill D.R. et al., 1994**) e la prima prova clinica approvata per correggere la SCID è stata effettuata da Anderson e colleghi nel 1991 (**Anderson et al., 1990; Blaese et al., 1993; Levine e Friedmann, 1991**). Cellule di sangue periferico CD34+ di pazienti sono state trasdotte con un  $\gamma$ -retrovirus che guidava l'espressione di ADA. Sebbene i diretti vantaggi di questo trial di terapia genica sono ancora in deliberazione, questo può essere considerato il primo "successo" umano della terapia genica, almeno per quanto riguarda i problemi di sicurezza.

Un evento importante e di grande rilevanza si ebbe nel **1999**, quando la terapia genica subì, tuttavia, una battuta d'arresto drammatica. Jesse Gelsinger, un diciottenne coinvolto nella sperimentazione di un nuovo trattamento per la cura di una malattia rara del sistema immunitario, una forma insolitamente lieve di malattia del fegato causata da mutazioni in un

gene sul cromosoma X, ebbe una reazione fatale e incontrollata al vettore virale utilizzato per somministrare il gene terapeutico. Il vettore virale a quanto pare aveva innescato una massiccia risposta immunitaria che gli causò insufficienza multipla degli organi e morte cerebrale (**Somia M. et al., 2000**). Al di là di diversi fatti contingenti riguardanti la morte di Jesse Gelsinger, fatti che pure hanno causato una revisione della regolamentazione di tutta la terapia genica negli Stati Uniti, questo evento ha rappresentato un punto di svolta perché ha fatto capire che la terapia genica è uno strumento potente, ma che può uccidere, al pari di tutti gli altri approcci terapeutici usati in medicina.

Un importante passo avanti nella terapia genica è stato fatto nel **2000**, quando 11 bambini con X-SCID sono stati corretti con l'introduzione della catena  $\gamma$ -comune del recettore dell'interleuchina nel midollo osseo usando un vettore retrovirale basato su MLV (**Cavazzana-Calvo et al., 2000**). Un approccio simile è stato successivamente pubblicato dal gruppo di Adrian Thrasher a Londra (**Gaspar H.B. et al., 2004**).

Purtroppo, in entrambi gli studi clinici si sono sviluppati casi di leucemia associati alla terapia genica ed a seguito di mutagenesi inserzionale indotta da retrovirus. E' interessante notare che questo problema era già stato preso in considerazione da un punto di vista teorico nei primi anni 1980 (**Cline M.J., 1985; Hacein-Bey-Abina et al., 2003; Howe et al., 2008**). In seguito a ciò, la US Food and Drug Administration degli Stati Uniti sospese circa il 15 per cento delle 200 sperimentazioni di terapia genica in corso al momento, una mossa definita come misura precauzionaria. Eventi come questi ebbero un impatto negativo sul campo e sulle aspettative della terapia genica ma servirono a comprendere e migliorare la sicurezza e l'efficienza dei vettori virali.

Un approccio simile alle sperimentazioni cliniche di X-SCID, la correzione di granulomatosi cronica X-linked è stato utilizzato nel 2005, sempre con un vettore  $\gamma$  retrovirale codificante gp91 phox nel midollo osseo (**Gottlieb M.S., 2006; Moreno-Carranza et al., 2009**). E' stato osservata una buona efficienza clinica probabilmente anche a seguito dell'attivazione inserzionale di MDS1-EVI1, PRDM16 e SETBP1 (**Ryser M.F. et al., 2007**).

Nel **2006**, è stata effettuato il primo trial di successo della terapia genica per il trattamento del melanoma. Per questo trattamento era stato progettato un retrovirus codificante le  $\alpha$  e  $\beta$  catene del recettore di cellule T (TCR) antigene specifico del melanoma (MART-1). Questo TCR fu clonato da un paziente che aveva mostrato regressione dopo terapia per trasferimento adottivo. I linfociti di sangue periferico, trasdotti *ex-vivo* con questo retrovirus in quindici pazienti, hanno indotto regressione completa in due soggetti (**Morgan R.A. et al., 2006**). Questo fu la prima dimostrazione che le cellule immunitarie possono essere geneticamente modificate per combattere il cancro in uno studio di terapia genica umana.

Nel marzo **2006** un gruppo internazionale di scienziati annunciò il successo della terapia genica nel trattamento di due pazienti adulti affetti da una malattia che colpisce le cellule mieloidi. Fu il primo studio a dimostrare che la terapia genica può curare malattie del sistema mieloidi. Nello stesso anno un gruppo di scienziati dell'Istituto San Raffaele-Telethon per la Terapia Genica (HSR-TIGET) di Milano svilupparono un protocollo per prevenire il rigetto da parte del sistema immunitario dei vettori più comuni usati nella terapia genica. In maniera simile al trapianto d'organo, infatti, anche la terapia genica è stata afflitta dal problema del rigetto immunitario. Nel novembre 2006 i ricercatori dell'University of Pennsylvania School of Medicine riferirono che tutti i pazienti, sottoposti ad una sperimentazione di fase I per il trattamento dell'infezione da virus dell'immunodeficienza umana, mostravano livelli di viremia nel sangue stabile o ridotta. Tuttavia, lo studio non ha evidenziato in maniera inequivocabile se tali risultati potessero essere imputati alla terapia genica o dipendessero dalle terapie farmacologiche somministrate in associazione.

Nel **2007** venne annunciato il primo trial di terapia genica per le malattie retiniche ereditarie. La prima sperimentazione fu condotta su un ragazzo di 23 anni britannico, Robert Johnson, affetto da Amaurosi Congenita di Leber, una malattia retinale degenerativa che causa cecità nell'infanzia. I risultati riportati indicarono un modesto aumento della capacità visiva e nessun apparente effetto collaterale. Nel trattamento di questa malattia Hauswirth e colleghi trovarono all'interno della retina dei target per il trattamento. I pazienti dimostrarono significativi miglioramenti nell'acuità visiva dopo essere stati trattati con un virus adeno-associato (AAV) che portava il gene *RPE65*, che aiuta a metabolizzare una forma di vitamina A che permette ai bastoncelli e ai coni di funzionare (**Jacobson S. G. et al., 2012**).

L'AAV è un virus comunemente usato nelle terapie geniche correnti. E' un virus non patogeno e non eccessivamente immunogenico e che non si integra nel genoma dell'ospite, così che, c'è un piccolo rischio di scatenare mutazioni che causano malattie, per esempio, attraverso l'attivazione di un oncogene. Il virus trasporta semplicemente il gene nel nucleo della cellula, ove forma piccoli cerchi di DNA chiamati **episomi** che possono essere espressi sotto il controllo di promotori, anche trasportati dal virus.

Lo svantaggio di questa strategia è che se il gene sostituito non si integra nel DNA della cellula, esso verrà perso quando la cellula si divide, mentre il DNA circolare non è replicato con il resto del genoma nucleare. Ma giacchè le cellule retinali sono estremamente di lunga durata, un virus non integrante è perfettamente adatto al trattamento delle malattie degli occhi.

Il principale fattore che limita l'utilizzo dei AAVs come vettori genici è la loro piccola dimensione, non più grande di una nanoparticella. Questo significa che possono solo trasportare circa 4.7 kilobasi di DNA, e che devono includere promotori che necessitano di regolare l'espressione del DNA terapeutico.

I primi esperimenti nella terapia genica per la cura di malattie agli occhi usava vettori adenovirali, che, come gli AAVs, sono vettori non integranti, ma, con un genoma di 36 kilobasi, possono trasportare geni terapeutici di dimensioni ben maggiori. I vettori adenovirali sono però molto immunogenici e possono risultare tossici con gravi danni per il paziente. Giacchè gli adenovirus entrano efficientemente in molti tipi cellulare ed esprimono geni terapeutici ad elevati livelli, sono oggetto di ricerche intensive per renderli più sicuri ed efficaci nel trattamento del cancro, diabete, HIV e malattie genetiche.

I vettori lentivirali possono veicolare fino a 9 kilobasi di materiale genetico. Rispetto agli adenovirus e AAVs, essi si integrano nel genoma, trasducendo la cellula in modo stabile ed esprimendo il gene terapeutico ad alti livelli.

Nonostante i risultati positivi e il gran numero di progetti di terapia genica iniziati, la maggioranza dei protocolli non arrivano alla fase di sperimentazione umana.

Fino al **2008**, solo due terapie geniche hanno effettivamente raggiunto il mercato. Il primo di questi è stato Gendicine, sviluppato da SiBiono GeneTech, lanciato in Cina nel 2004, dopo 14 anni di sviluppo, per il trattamento del carcinoma squamoso della testa e del collo. Gendicine consiste nel gene onco-soppressore p53 inserito all'interno di un vettore adenovirale. Uno studio di fase III, eseguito su 120 pazienti terminali affetti da carcinoma squamoso della testa e del collo, mostra un aumento dell'efficacia di oltre tre volte in seguito a trattamento con Gendicine associato a chemioterapia e radioterapia. Inoltre, i pazienti non terminali non presentano recidive per i successivi tre anni di follow-up. Il secondo caso avviene nel 2007, quando Regin-G, sviluppato da Biotecnologie Epeius, è stato lanciato nelle Filippine per un ampio spettro di tumori metastatici intrattabili. Analogamente a Gendicine, Regin-G è stato progettato per legarsi alle cellule cancerose in cui determina l'espressione di un gene oncosoppressore. Nel caso di Regin-G questo risultato si ottiene utilizzando il gene della ciclina-G1 inserito in un vettore retrovirale. Un vantaggio di questo farmaco è che non deve essere iniettato nelle cellule tumorali ma può essere somministrato per via endovenosa. Vista la sua efficacia, è stato classificato come farmaco orfano ed è disponibile per uso compassionevole in Giappone dal 2007.

Anche l'Italia è molto impegnata nel campo della terapia genica. Nell'ultimo decennio, sono state avviate diverse sperimentazioni, alcune delle quali tuttora in corso. Questo excursus storico dimostra che la terapia genica sta muovendo i suoi primi passi con una velocità impensabile fino a pochi anni fa; tuttavia, numerose difficoltà dovranno essere ancora superate.

Al giorno d'oggi stiamo rivivendo momenti eccitanti. Nell'ultimo decennio sono stati compiuti significativi passi in avanti: dalla clonazione somatica (**Wilmot I. et al., 1997**), il completamento del progetto del genoma umano (**Venter J.C et al., 2001**), alla scoperta di sistemi di regolazione genica basata su microRNA (**Lombardo A. et al., 2007**).

Al momento, si segnalano terapie geniche di successo in varie forme di cecità ereditaria, HIV, emofilia, malattie neuro-degenerative, e una varietà di cancro.

Anche se nessuna terapia genica ha ancora ricevuto l'approvazione FDA, circa 2.000 studi clinici sono stati avviati nei soli ultimi 5 anni, molti con risultati importanti e, grazie al miglioramento dei vettori e alle tecniche, minimi effetti tossici.

Risale al dicembre scorso 2011 il successo più recente nella terapia genica per l'emofilia B (**Nathwani A.C. et al., 2011**). E' stato usato un vettore AAV che trasportava un gene che codifica una versione funzionale del fattore di coagulazione noto come fattore IX. I ricercatori nel Regno Unito infusero questo vettore in sei uomini con grave emofilia B. Un singolo trattamento è stato sufficiente per aumentare il fattore di coagulazione IX a livelli che, pur ben al di sotto del normale, erano capaci di permettere a 4 dei pazienti di interrompere del tutto la terapia sostitutiva con fattore IX e agli altri di dover ricorrere meno frequentemente ad iniezioni del fattore di coagulazione.

.

## Cap. 6. Terapia genica e vettori virali

La terapia genica si basa sulla possibilità di curare le malattie mediante l'inserimento di materiale genetico all'interno delle cellule. La cellula prende il nome di recipiente, o cellula ricevente, e il processo è una forma di trasduzione genica; il gene trasferito si chiama transgene e il veicolo usato per la trasduzione nella cellula ricevente è denominato vettore (**Lollini P-L. et al., 2001**).

La trasduzione genica di cellule di mammifero viene utilizzata da oltre trent'anni, ma molti metodi, ad esempio la trasfezione mediante plasmidi di origine batterica, sono caratterizzati da una bassa efficienza e sembravano prestarsi soprattutto a studi sperimentali *in vitro*.

Oltre ad aver dato un contributo sostanziale all'analisi funzionale di geni cellulari, la trasduzione è stata vista sin da subito come un sistema con il quale correggere difetti genetici (terapia genica) o far esprimere proteine terapeutiche (es. ormoni, fattori di crescita ecc.) e immunogeni per vaccinare contro agenti infettivi o tumori.

È stata la messa a punto di vettori virali ad alta efficienza di trasduzione, tra gli anni '70 e '80, a permettere di iniziare a progettare sperimentazioni precliniche e cliniche basate sul trasferimento genico *in vivo*.

Il maggiore ostacolo per il successo della terapia genica, però, è rappresentato dalla difficoltà di trovare un sistema virale che raggiunga un livello di efficienza sufficiente nell'infettare tutte le cellule bersaglio. Un altro punto critico nasce dal fatto che il virus ingegnerizzato potrebbe essere riconosciuto come corpo estraneo dall'organismo e suscitare quindi una reazione immunitaria. Un terzo problema da risolvere è di rendere l'espressione del gene terapeutico persistente nel tempo senza bisogno di doversi sottoporre a continui trattamenti. Un altro possibile rischio è che il virus dia origine a particelle capaci di riprodursi in modo incontrollato e che trasporti all'interno della cellula anche dei componenti tossici (come le proteine del capsido).

Attualmente sono disponibili numerosi tipi di vettori virali, basati su retrovirus, adenovirus, AAV, herpes ed altri ancora. In **Tabella 4** sono elencati i principali vettori virali con i loro vantaggi e svantaggi nell'ambito biomedico.

Esistono anche vettori non virali per effettuare il trasferimento del gene terapeutico all'interno della cellula bersaglio. Di solito sono formati da nanoparticelle cariche positivamente che formano interazioni elettrostatiche con il DNA carico negativamente, ma rispetto ai vettori virali, hanno un'efficienza nettamente minore.

VETTORE	VANTAGGI	SVANTAGGI
<b>Retrovirale</b>	Integrazione nel genoma cellula ospite. Dimensioni DNA eterologo $\leq 8$ Kb. Produzione vettore a titoli $10^6$ alla $10^8$ pfu/ml (pfu= unità formanti placca). Ingegnerizzazione relativamente semplice. Ampio tropismo cellulare. Scarsa immunogenicità. No popolazione preimmune.	Targeting cellulare difficile. Infetta solo cellule in fase di attiva divisione. Integrazione casuale. Mutagenesi inserzionale. Instabilità dei vettori.
<b>Lentivirale</b>	Infetta cellule in divisione e quiescenti. Integrazione nel genoma cellula ospite. Prolungata espressione del transgene. Dimensioni DNA eterologo $\leq 9$ Kb. Può essere reso incapace di integrarsi.	Potenziata mutagenesi inserzionale. Presenza di proteine regolatorie (tat, rev ed altre) nel costrutto di packaging. Espressione transiente nel vettore difettivo per integrazione.
<b>Adenovirale</b>	Infetta cellule in divisione e quiescenti. Alti livelli di espressione del transgene. Dimensioni DNA eterologo $\leq 8$ Kb. Produzione vettore a titoli $10^6$ alla $10^8$ pfu/ml.	Risposta immune contro proteine vettore. No integrazione in genoma cellula ospite. Espressione transiente. Elevati livelli di popolazione preimmune.
<b>Adeno-associato</b>	Infetta cellule in divisione e quiescenti. Virus parentale apatogeno. Ampio tropismo cellulare. Potenziale integrazione sito-specifica. Scarsa immunogenicità.	Dimensioni DNA eterologo $\leq 5$ Kb. Difficile produrre preparati ad alto titolo. Richiede adenovirus o herpes virus come helper.
<b>Erpetico</b>	Ampio tropismo cellulare. Dimensioni DNA eterologo $\leq 50$ Kb. Tropismo naturale per cellule neuronali (se derivato da HSV) e linfociti B (EBV). Produzione vettore a titoli $10^6$ alla $10^8$ pfu/ml.	Possibile citotossicità residua. No integrazione DNA cellulare. Espressione transgene transiente. Rischio di ricombinazione. Elevati livelli di popolazione preimmune.
<b>Poxvirale</b>	Dimensioni DNA eterologo $\leq 30$ Kb. Possibilità di inserire DNA eterologo in più punti del genoma vettore. Alti livelli di espressione del transgene. Idonei all'uso come vaccini ricombinanti vivi attenuati. Ridotti livelli di popolazione preimmune.	Potenziatamente citotossici. Generazione ricombinanti complicata. Risposta immune contro proteine vettore. Uso di promotori eterologhi complicato.

Tabella 4. Principali vettori virali, vantaggi e limiti in ambito biomedico

## 6.1. Vettori retrovirali

I retrovirus sono stati i primi ad essere utilizzati per integrare il proprio genoma in quello della cellula ospite, trasducendola in modo stabile. Nel decennio scorso, infatti, la maggior parte degli studi clinici in vivo sono stati condotti con vettori retrovirali. Per problemi legati alla sicurezza in vivo, sono stati sostituiti da vettori derivati da virus diversi; tra questi i lentivirus che, nonostante siano molto affini ai retrovirus, presentano delle caratteristiche che ne aumentano la sicurezza in ambito vettorologico. Retrovirus e lentivirus sono accomunati da una modesta immunogenicità e da una nulla immunità di popolazione.

I vettori retrovirali sono in massima parte derivati dal virus della leucemia murina di Moloney (MMLV), un retrovirus anfotropico che utilizza come recettore un fosfolipide di membrana diffuso ed evolutivamente conservato ed è quindi capace di infettare cellule murine e di altre specie incluse quelle umane.

Il genoma dei retrovirus è costituito dai promotori *long terminal repeat* (LTR), presenti alle estremità, e i geni *gag, pol ed env* (oltre ad altre proteine). Vi sono inoltre tratti di sequenza non codificanti ma che svolgono un ruolo importante nella retrotrascrizione, nel legame con nucleoproteine, nella veicolazione del genoma al nucleo ecc. Uno di questi è il dominio *psi* ( $\Psi$ ) necessario al *packaging* (incapsidamento del genoma retrovirale nella progenie virale) e compreso tra l'LTR in 5' e l'inizio di *gag* (**Figura 10**). Il concetto base dei vettori retrovirali sta nel fatto che le poliproteine *gag, pol ed env*, essenziali nella replicazione, possono essere fornite in *trans* (cioè da plasmidi o costrutti esterni) e che i relativi geni presenti nel genoma retrovirale possono essere sostituiti da DNA eterologo. E' possibile, quindi, produrre virioni contenenti il vettore retrovirale mediante due costrutti. Il primo, chiamato anche costrutto di *packaging*, contiene l'intero genoma retrovirale, è sprovvisto del dominio *psi* e ha, spesso, LTR modificati. Il secondo costrutto, il vettore vero e proprio, contiene LTR e dominio *psi* mentre *gag, pol ed env* sono sostituiti da uno o più geni eterologhi, il costrutto di *packaging* funzionerà come un *helper* e fornirà tutte le proteine necessarie alla replicazione e all'assemblaggio delle particelle che incorporeranno il solo vettore per la presenza del dominio *psi* in quest'ultimo.

Ingegnerizzazione del genoma e generazione delle particelle vettore sono semplici. I due costrutti sono, infatti, generati a partire dal pro virus (ad es. clonato in un plasmide) e sono poi trasfettati in cellule eucariotiche (di solito epiteliali) chiamate anche **cellule *packaging***. Dall'espressione dei due costrutti si generano le proteine retrovirali e tutto l'occorrente per la formazione delle particelle vettore che vengono quindi rilasciate nel supernatante di coltura già a poche ore dalla trasfezione. Dopo purificazione per eliminare i detriti cellulari, il supernatante può essere usato direttamente o conservato in aliquote congelate a basse temperature. Oltre a semplicità costruttiva e facile produzione, i vettori retrovirali hanno una discreta capacità di

*delivery*. Con la rimozione di *gag*, *pol* ed *env*, è possibile, infatti, trasportare fino a 7-8 Kb di acido nucleico eterologo.

La trasduzione, sia *in vitro* che *in vivo*, avviene attraverso un processo di infezione con le particelle vettore che, una volta all'interno della cellula, daranno luogo a retrotrascrizione, veicolazione all'interno del nucleo e integrazione del genoma vettore nella cellula ospite. Mancando *gag*, *pol* ed *env*, la replicazione si arresterà e il vettore provirale esprimerà il solo *transgene*. L'espressione di quest'ultimo è regolata dall'LTR o da un proprio promotore. Poiché il vettore è integrato nel Dna genomico, la cellula sarà trasdotta in modo stabile e il *transgene* verrà ereditato dalle cellule figlie.

Un problema dei vettori retrovirali riguarda la mutagenesi inserzionale che deriva dall'integrazione (casuale e difficilmente orientabile) del vettore nel genoma della cellula ospite. Per aumentarne la sicurezza, sono state preparate generazioni successive per abbattere il rischio di generazione di particelle virali infettanti e mutagenesi inserzionale. Per il primo aspetto, la generazione delle particelle vettore è ora eseguita per trasfezione con tre plasmidi. Il vettore è rimasto invariato mentre il *packaging* è ora organizzato in due costrutti. Uno fornisce *gag* e *pol* (e per convenzione è comunque chiamato *packaging*), l'altro codifica per il gene *env*. Oltre a ridurre al minimo la possibilità di generare un genoma infettante per ricombinazione tra costrutti, l'utilizzo di *env* in *trans* consente di utilizzare recettori virali diversi operando così sul **targeting cellulare**. Questo espediente aumenta la versatilità e il campo di applicazione dei vettori, tanto è che la stessa strategia è ora utilizzata per la maggior parte dei vettori virali.

La mutagenesi inserzionale è alla base dei meccanismi di trasformazione dei retrovirus e si verifica quando il genoma retrovirale si inserisce in prossimità di un oncogene cellulare e ne stimola la trascrizione mediante *cis*-attivazione. Sebbene l'integrazione non richieda una particolare omologia di sequenza tra genoma virale e cellulare, questa avviene preferenzialmente nell'eucromatina che, a differenza dell'eterocromatina, è trascrizionalmente attiva. I retrovirus inoltre, tendono a integrarsi in prossimità dei promotori cellulari a supporto della loro **maggior oncogenicità** rispetto ai lentivirus. Tra le varie modifiche apportate a questi vettori ci sono la costruzione di vettori auto inattivanti e/o difettivi per integrazione che ha elevato di molto il livello di sicurezza. I primi, hanno LTR non funzionali e l'espressione del *transgene* è quindi regolata da un proprio promotore; ai secondi manca l'integrasi e quindi rimangono allo stato episomiale. L'inattivazione degli LTR avviene, di solito, per delezione parziale o completa della regione U3 dell'LTR 3'. Durante la retrotrascrizione, la delezione è duplicata nell'LTR 5' inattivando anche questo LTR. Sono concettualmente simili i vettori in cui gli LTR sono inattivati per sostituzione della regione U3 con sequenze eterologhe che consentono una facile tracciabilità del vettore o un'aumentata risposta a determinati stimoli della cellula o esterni. I vettori difettivi per integrazione sono prodotti invece utilizzando dei costrutti di *packaging* con *pol* mutato nella porzione codificante l'integrasi. Le particelle

generate saranno quindi prive di questo enzima e il genoma vettore, convertito in DNA a doppia catena circolare, rimarrà allo stato episomiale nel nucleo della cellula. Rispetto a quanto si pensava in passato, oggi il *transgene* è espresso discretamente *in vitro* e *in vivo* per oltre una settimana. L'efficienza è ovviamente più bassa rispetto al vettore tradizionale e la mancata integrazione comporta la progressiva diluizione del vettore con il susseguirsi delle divisioni cellulari. Questa strategia non è quindi adatta per trasduzioni stabili ma trova utili applicazioni in **ambito vaccinale** quando l'espressione del *transgene* (immunogeno) è richiesta solo per brevi periodi.

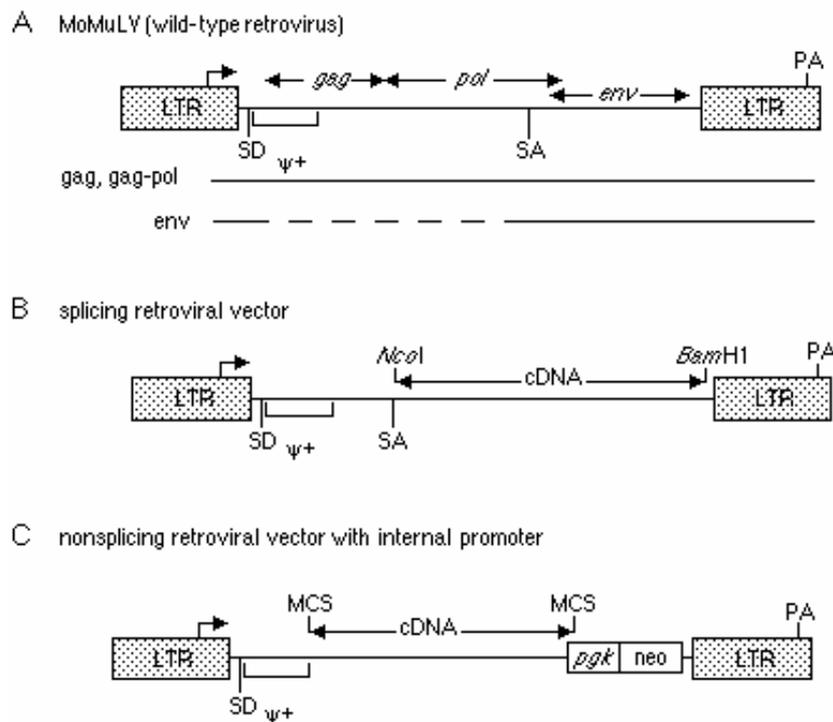


Figura 10. A) Struttura del virus wild-type della leucemia murina di Moloney (MMLV). B) Struttura di un vettore retrovirale di splicing. C) Struttura di un vettore retrovirale di non-splicing che contiene un promotore interno. Cepko *et al.*, 2001

## 6.2. Vettori lentivirali

I lentivirus appartengono alla stessa famiglia dei retrovirus e hanno pertanto la stessa organizzazione genomica e stesso ciclo replicativo. Rispetto ai retrovirus, nei quali il targeting al nucleo può avvenire solo durante la fase di mitosi cellulare (cioè quando la membrana cellulare è temporaneamente scomparsa), i lentivirus infettano e replicano anche in cellule quiescenti, cioè non in fase replicativa. Ciò è dovuto al fatto che i lentivirus possiedono delle proteine accessorie che veicolano al nucleo il DNA retrotrascritto e ne facilitano l'integrazione.

Poiché la maggior parte delle cellule in un organismo adulto sono ormai differenziate e pertanto non si dividono, è evidente il grande vantaggio dei vettori lentivirali rispetto ai retrovirali.

Seconda importante caratteristica distintiva è il fatto che oltre a *gag*, *pol* ed *env*, i lentivirus possiedono vari geni regolatori le cui proteine modulano la replicazione virale e contrastano i sistemi di difesa cellulare.

Da un lato questo complica l'ingegnerizzazione e la costruzione di un vettore, dall'altro è possibile sfruttare queste proteine per aumentarne le capacità di *delivery*. Terza differenza è dato dal fatto che i lentivirus tendono ad integrarsi lontano dai promotori cellulari e presentano quindi un basso rischio di mutagenesi inserzionale. Questo rischio è ulteriormente diminuito dal fatto che gli LTR dei lentivirus hanno un'attività promotrice costitutivamente bassa e che viene indotta, nel caso di HIV, da *Tat*, una proteina *trans* attivante prodotta nelle fasi iniziali della replicazione.

Oltre ad HIV, dal quale sono stati derivati vettori ad altissime prestazioni ma con problemi di sicurezza non trascurabili a priori, sono stati sviluppati vettori a partire dai virus dell'immunodeficienza della scimmia, del bovino, del felino (FIV) e dal virus dell'anemia equina infettiva (EIAV). I vettori FIV ed EIAV derivati, pur avendo prestazioni leggermente inferiori, presentano minori rischi rispetto a quelli derivati da HIV e sono utilizzati sia nell'uomo che nel settore veterinario.

Dal punto di vista costruttivo e di produzione, i vettori lentivirali sono molto simili ai vettori retrovirali. Oltre al *psi* che nei lentivirus si estende alla porzione iniziale di *gag*, una differenza sostanziale è data dal fatto che nei lentivirus l'esportazione dal nucleo al citoplasma degli RNA messaggeri che non hanno subito splicing avviene grazie alla proteina *Rev* che legano il *Rev-Responsive Element* (RRE). E' necessario quindi inserire RRE sia nel costrutto vettore che in quello di *packaging* e fornire *Rev* o tramite il costrutto di *packaging* o in *trans* con un costrutto separato (**Figura 11**).

Sono stati recentemente sviluppati vettori HIV- e FIV-derivati per integrazione e che si sono dimostrati efficaci soprattutto in ambito vaccinale. Per questi valgono le stesse limitazioni descritte per gli analoghi vettori retrovirali.

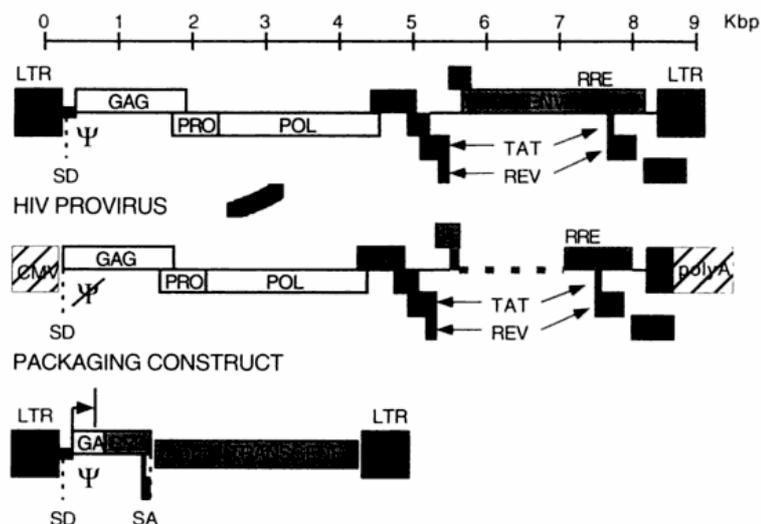


Figura 11. Disegno schematico di costrutti usati per fare vettori lentivirali. Verma *et al.*, 1999

### 6.3. Vettori adenovirali

Sono i vettori più utilizzati e trovano maggiore impiego nella veicolazione di immunogeni a scopo vaccinale che nella correzione di difetti genetici. Derivano dagli adenovirus, virus a DNA a doppia catena senza involucro che infettano un'ampia gamma di specie. Gli adenovirus che infettano l'uomo sono distinti in oltre cinquanta sierotipi sulla base della neutralizzabilità da parte di antisieri specifici. Questi sierotipi sono a loro volta suddivisibili nelle specie da A a F sulla base delle proprietà emoagglutinanti.

Per elevate capacità infettanti, ampio tropismo, trasporto del genoma virale al nucleo e bassa patogenicità, gli adenovirus sono potenzialmente degli ottimi vettori. A questi vantaggi si oppongono però una diffusa immunità di popolazione che impedisce l'uso dei sierotipi più comuni e un'elevata immunogenicità che limita il numero di somministrazioni effettuabili. In pratica, dopo la seconda somministrazione, la risposta immune anti-vettore indotta è tale che una terza somministrazione potrebbe scatenare gravi reazioni anafilattiche.

I primi vettori sono stati derivati dagli adenovirus di tipo 2 e 5 appartenenti al sottotipo C e associati a lievi forme di infezione nell'uomo. A questi era stato deleto il gene E1A (E da *early*, precoce) per renderli incapaci di replicare e creare uno spazio sufficiente per l'inserzione del *transgene*. Sono seguite generazioni successive di vettori nei quali la delezione è stata estesa ai geni E1B ed E3 aumentando così la capacità di trasporto di acido nucleico eterologo a 7-8 Kb. La sua produzione richiede la presenza di un virus helper che fornisca in *trans* le funzioni mancanti. Si utilizzano quindi delle cellule di *packaging* che sono co-trasfettate con i costrutti vettore ed *helper* o che esprimono in modo stabile E1A e i geni precoci occorrenti. La produzione di vettore è ad alto titolo permettendo un'elevata efficienza di trasduzione. Questi vettori presentano inoltre ampio tropismo in vivo e capacità di infettare cellule quiescenti.

Tra i principali svantaggi vi sono l'espressione transiente del *transgene* – il vettore permane nelle cellule allo stato episomiale – e la tossicità *in vivo* dovuta alle proprietà pro infiammatorie di alcune proteine virali codificate dal vettore. Nei vettori di generazione successiva si è cercato di ridurre la tossicità eliminando porzioni sempre più estese di genoma virale fino a lasciare le sole estremità terminali invertite e la sequenza *psi* di *packaging*.

Altre caratteristiche del vettore, limitanti in terapia genica ma vantaggiose per vaccinazione, sono l'elevata ma transiente espressione del *transgene*, l'alta infettività *in vivo* e l'ampio tropismo. Per cercare di combinare queste caratteristiche a una trasduzione stabile e una prolungata espressione del *transgene*, sono stati prodotti vettori chimerici tra adenovirus e retrovirus o altri.

Recentemente i vettori adenovirali hanno fornito buoni risultati anche nel trattamento dei tumori solidi.

#### 6.4. Vettori AAV

I vettori da AAV sono in uso clinico da vari anni grazie al fatto che, nonostante l'infezione sia molto diffusa, questi virus non presentano patologia, i AAV sono virus a DNA a singola catena che infettano un ampio spettro di cellule ma che, per completare il proprio ciclo replicativo, hanno bisogno di un virus *helper*, di solito un adenovirus o herpes virus. Il genoma di AAV contiene due soli geni, *rep* (replicasi) e *cap* (proteine capsidi che) compresi tra due *internal terminal repeat*. Questi due geni sono in gran parte rimossi nei vettori AAV.

Oltre a mancanza di patogenicità, i AAV sono buoni candidati vettori per **bassa immunogenicità, integrazione del genoma in una regione specifica del cromosoma 19 dell'uomo** (che quindi può essere trasmesso alle cellule figlie) e **capacità di infettare cellule differenziate e quiescenti *in vivo***. Vettori AAV, infatti, trasducono stabilmente cellule muscolari, neuronali periferiche e del sistema nervoso centrale, epatociti, cellule staminali ematopoietiche e altre. Questi vettori sono già utilizzati per la cura di malattie ereditarie monogeniche.

I principali svantaggi sono le ridotte dimensioni di acido nucleico eterologo inseribile nel genoma (fino a 5 Kb) e una certa difficoltà nel generare le particelle vettore alla quale si sommava la difficoltà di rimozione del virus *helper* utilizzato nella produzione. Questo problema è stato risolto successivamente con l'uso di cellule *packaging* esprimenti con plasmidi codificanti le proteine adenovirali necessarie alla replicazione di AAV. Altro svantaggio è che per l'integrazione sito-specifica è necessaria *Rep*. Poiché il relativo gene è stato rimosso, i vettori AAV hanno perso questa proprietà. Tra le varie strategie adottate per ovviare a questo limite, la produzione di **vettori ibridi AAV-adenovirus** o **AAV-herpes virus**, sebbene complicata, ha mostrato buoni risultati.

## 6.5. Vettori erpetici

Per la maggior parte sono derivati dal **virus herpes simplex di tipo-1 (HSV-1)**, un virus con genoma a DNA doppia catena di 150 Kb codificante per circa 90 geni. Nei vettori erpetici è possibile inserire fino a 50 Kb di DNA eterologo. L'HSV-1 ha ampio tropismo cellulare e infetta cellule in fase di attiva divisione o quiescenti. L'infezione può essere di tipo litico o latente. In entrambi i casi il genoma permane allo stato episomiale. I vettori erpetici trovano particolare applicazione nella **trasduzione transiente** di grandi frammenti di DNA eterologo in cellule neuronali verso cui HSV ha naturale tropismo.

Tra i limiti dei vettori erpetici i più problematici sono **tossicità verso le cellule infette e antigenicità**. A questo si è cercato di ovviare eliminando il maggior numero di geni virali possibile nei vettori ricombinanti o ricorrendo all'uso di ampliconi. Altri aspetti da considerare per l'uso clinico sono la risposta immune anti-HSV che potrebbe inattivare il vettore o colpire le cellule trasdotte ed esprimere antigeni HSV in superficie, la possibilità di generare virus replicazione-competente per ricombinazione e la ridotta durata di espressione del *transgene*. Questi limiti si sono tradotti in importanti vantaggi nella terapia oncologica. Infatti, le proprietà citolitiche dei vettori HSV replicazione-competenti sono state sfruttate nell'oncolisi di tumori cerebrali. In vettori veicolanti la timidina chinasi di HSV, la citotossicità può essere aumentata somministrando **aciclovir**, un analogo nucleotidico antierpetico che, dopo attivazione da parte della timidina chinasi virale, interrompe la sintesi del DNA portando a morte la cellula. Visto i buoni risultati nei modelli animali, i vettori HSV sono ora in fase di sperimentazione clinica contro gliomi, glioblastomi, altri tumori.

Oltre ad HSV-1 sono stati derivati vettori dal **virus Epstein-Barr** che trova impiego nella correzione di difetti genetici in queste cellule e nella terapia contro linfomi B.

## 6.6. Vettori poxvirali

Questi vettori sono caratterizzati da elevati livelli di espressione genica a livello citoplasmatico. Derivano da **virus vaccinico**, naturale o modificato, da poxvirus di specie aviarie (**virus fowlpox e canarypox**) e da diversi altri membri della famiglia *Poxviridae*. Come i vettori erpetici, i vettori poxvirali trasportano DNA eterologo di grandi dimensioni (25-30 Kb). A differenza degli altri vettori però, l'inserzione di questo DNA non avviene per clonaggio diretto ma per **ricombinazione omologa**, procedimento più lungo e complicato rispetto al consueto clonaggio in plasmidi o cosmidi. I poxvirus possiedono propri enzimi per effettuare la trascrizione e quindi replicano nel citoplasma.

I virus vaccinici hanno **elevata capacità citocida** e sono **molto immunogenici**. Per questo motivo e per l'elevata espressione del transgene i vettori poxvirali sono impiegati soprattutto in

ambito vaccinale. Dai virus parentali sono stati sviluppati **vettori replicazione-competenti attenuati e vettori difettivi per replicazione**. Tra i vari tipi di attenuazione che sono stati ottenuti, particolarmente importante per uso clinico risulta essere la competenza alla replicazione ristretta alle cellule della specie ospite naturale.

Grazie alla spiccata immunogenicità, i vettori vaccinici trovano impiego ottimale in **vaccinazioni combinate tipo *prime-boost*** in cui il *priming* del sistema immune è eseguito con vaccini DNA o altri a blanda immunogenicità seguito da un forte richiamo (*boost*) con il vettore vaccinico. Considerata la sicurezza *in vivo* e nonostante complessità biologica e difficoltà nella produzione dei vettori ricombinanti, è probabile che questi sistemi di *delivery* diventino una componente importante nei futuri vaccini.

### **6.7. Vettori da altri virus**

Sono stati derivati vettori da virus a RNA a singola catena appartenenti al genere *Alphavirus* come *virus Seimlik Forest*, *Sindbis* ed *Encefalite Equina Venezuelana*. Questi virus sono considerati buoni vettori vaccinali per ampio tropismo e spettro d'ospite e perché garantiscono produzioni di vettore ad alto titolo.

## Cap. 7. Uno sguardo alle prospettive future: le nucleasi zinc-finger

Nel 2007, Timothy Brown, un quarantenne Americano che viveva a Berlino, ebbe una ricaduta di leucemia mieloide acuta e ricevette un trapianto di midollo osseo per aumentare le sue difese immunitarie. Giacchè egli era affetto anche da HIV, il suo medico scelse un donatore con una mutazione in entrambe le copie del gene CCR5, che codifica un co-recettore HIV trasportato sulla superficie delle cellule T al quale l'HIV di solito deve legarsi per entrare nelle cellule. La gente con mutazioni in entrambe le copie del gene CCR5 sono resistenti all'infezione da HIV. Un anno dopo, Brown ebbe nuovamente una ricaduta, e ancora una volta ricevette un trapianto di cellule staminali dal donatore con CCR5 mutante. Infine, egli sconfisse il cancro e, a partire dal 2010, l'HIV nelle sue cellule non era rilevabile e lo continua ad essere tutt'ora, dopo oltre due anni dalla sospensione del trattamento antivirale e immunosoppressivo (**Hütter G. et al., 2009**). E' molto probabile quindi che Brown sia la prima persona ad essere guarita dall'infezione da HIV.

L'impressionante risultato diede una grossa spinta a questo approccio. Piuttosto che sostituire o integrare un gene mutato con una copia normale, le ricerche si proposero di introdurre una copia mutante del gene per il co-recettore CCR5 dell'HIV nelle cellule T di pazienti affetti da HIV. Questo previene l'espressione di CCR5 sulla superficie cellulare, e in questo modo inibisce l'infezione cellulare da HIV. L'infezione da HIV-1 richiede la presenza di un recettore CD4 e un recettore delle chemochine, principalmente il CCR5. Le persone che hanno mutazioni nel gene CCR5, omozigosità per una delezione di 32 bp nell'allele CCR5 e che impedisce l'espressione del recettore, sono altamente resistenti all'infezione da HIV.

Lo studio è stato fatto *ex-vivo*. Per mutare il gene CCR5, venivano estratte le cellule T di pazienti e veniva usato un vettore adenovirale per trasportare le nucleasi zinc-finger (ZFNs) nelle cellule T che esprimevano la glicoproteina recettore CD4. Piuttosto che integrare semplicemente le cellule con una copia mutante di CCR5, che avrebbe lasciato una copia normale nel suo posto per continuare a produrre i recettori normali CCR5, le ZFNs modificano attualmente il gene esistente per renderlo non funzionante. Come risultato, le cellule non esprimono il recettore CCR5 sulla loro superficie, e in questo modo non possono essere infettati da HIV (**Hütter G. et al., 2009**).

I risultati preliminari di queste prove, presentati al Congresso sulle Infezioni Opportunistiche e Retrovirali nel marzo 2012, avevano mostrato che tutti i 21 pazienti con HIV trattati con una infusione delle loro stesse cellule T modificate avevano ben tollerato il trattamento, e mostravano un aumento nelle conte delle cellule T CD4+ più di un anno dopo. E quando sei dei pazienti fecero una pausa programmata di 12 settimane dal trattamento antiretrovirale, essi presentarono una carica virale più bassa che correlava con i livelli di cellule T CD4+ modificate

circolanti. Un paziente, che naturalmente portava una copia del gene difettivo CCR5, aveva dei livelli virali non rilevabili.

### **7.1. Le nucleasi attivatori trascrizionali simil effettori (transcription activator like effectors nucleases - TALENs.)**

Le ZFNs e le meganucleasi tagliano specifiche sequenze di DNA bersaglio *in vivo* e sono potenti strumenti per la modificazione del genoma (Carroll D., 2008; Cathomen e Joung 2008; Galetto R. *et al.*, 2009). Rotture cromosomiche create da queste nucleasi ingegnerizzate stimolano la ricombinazione omologa o il gene targeting: in presenza di un template per la riparazione del doppio filamento di rottura, una specifica sequenza di DNA cambia nel template e viene incorporata nei cromosomi o vicino al sito di rottura. In assenza di un template di riparazione, i cromosomi rotti vengono ricongiunti con estremità non omologhe, che spesso introduce brevi inserzioni di DNA o delezioni che creano dei geni targets knockouts. Per entrambi ZFNs e meganucleasi, un ostacolo al loro utilizzo diffuso è stata la sfida in ingegneria di nuove specificità di DNA binding. Mentre significativi progressi sono stati compiuti negli ultimi anni (Urnov F.D. *et al.*, 2005; Fajardo-Sanchez *et al.*, 2008; Maeder M.L. *et al.*, 2008; Kim H.J. *et al.*, 2009), generare i reagenti necessari per modificare nuovi targets di DNA è ancora una ricerca intensiva.

Un nuovo dominio DNA binding è stato recentemente descritto in una famiglia di proteine note come attivatori trascrizionali tipo effettori (le TALEs) (Boch J. *et al.*, 2009; Moscou e Bogdanove, 2009). I TALEs sono prodotti da agenti patogeni delle piante del genere *Xanthomonas*, che portano le proteine nelle cellule vegetali durante l'infezione mediante il pathway di secrezione di tipo III (Bogdanove A. J. *et al.*, 2010). Una volta all'interno della cellula vegetale, i TALEs entrano nel nucleo, legano le sequenze di DNA effettore specifiche, e trascrizionalmente attivano l'espressione genica. Tipicamente, l'attivazione di geni targets aumenta la suscettibilità vegetale alla colonizzazione del patogeno, ma in alcuni casi, si innesca la difesa delle piante. Il TALE che si lega al DNA è mediato da una regione centrale di queste proteine che contiene ben 30 ripetizioni in tandem di una sequenza di 33–35 amminoacidi (Figura 12).

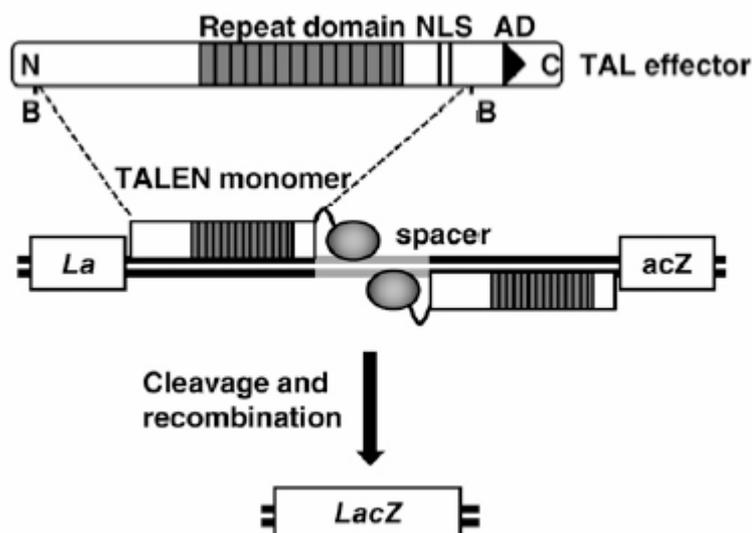


Figura 12. Struttura e attività delle nucleasi TALE (TALENs) (A) Schema di una proteina attivatrice trascrizionale simil effettore (TALE). Michelle C. *et al.*, 2010

La sequenza amminoacidica di ogni ripetizione è in gran parte invariante, con l'eccezione di due amminoacidi adiacenti (il diresiduo variabile ripetuto o RVD). Le ripetizioni con diverse RVDs riconoscono le diverse coppie di basi del DNA, e c'è una corrispondenza ad uno-ad-uno tra le RVDs nel dominio di ripetizione e i nucleotidi nella sequenza di DNA target (**Boch J. *et al.*, 2009; Moscou e Bogdanove, 2009**) (**Figura 13**). Utilizzando questo codice, sono stati correttamente previsti i targets di nuovi TALEs, e sono stati generati targets funzionali di TALEs composti da ripetizioni assemblati casualmente (**Boch J. *et al.*, 2009; Moscou e Bogdanove, 2009; Romer P. *et al.*, 2010**). La capacità di predire la specificità di legare il DNA di nativi o artificiali TALEs suggerisce una varietà di applicazioni di queste proteine nelle modificazioni target dei genomi. In particolare, il dominio di riconoscimento del DNA potrebbe dirigere una nucleasi legata ad una sequenza specifica di DNA. Inoltre, la modularità apparente delle ripetizioni dovrebbe consentire la costruzione rapida di nucleasi TALE (TALENs) con nuove specificità per destinare i doppi filamenti rotti in punti specifici del genoma.

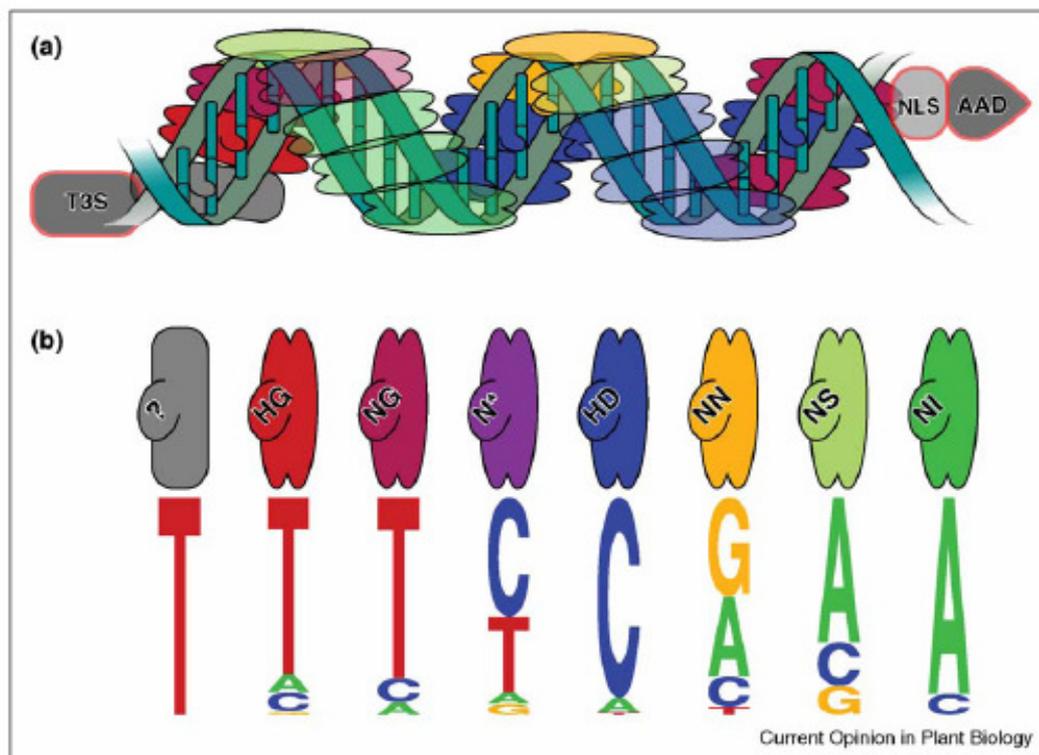


Figura 13. Riconoscimento DNA-TALE (a) Un modello-prova per l'associazione DNA-TALE. Il dominio centrale TALE di legame al DNA è costituito da 33-35 elementi di ripetizione amminoacidica che formano una piega a forma di solenoide superelicoidale avvolgente il DNA. I diresidui variabili ripetuti (RVDs, posizioni 12 e 13 in ogni ripetizione) definiscono la specificità di DNA del TALE e si presume siano associati ad uno ad uno con nucleotidi specifici o paia di basi. Le ripetizioni sulla faccia prossimale del DNA sono semi-trasparenti per chiarezza. (b) Associazione tra i più comuni RVDs e i nucleotidi. L'altezza delle lettere rappresenta la frequenza relativa rispetto ad altri nucleotidi per quel RVD. I nucleotidi rappresentano il filamento positivo del sito di legame, ma non si sa se i contatti sono fatti sul filamento positivo, su quello negativo, o su entrambi. Adam J., 2010

Per verificare questa idea, sono stati modificati i TALEs utilizzando l'architettura molecolare usata per le ZFNs. Le ZFNs funzionano come dimeri, con ogni monomero comprendente un dominio di legame al DNA (una matrice zinc finger) fusa al dominio catalitico dell'enzima di restrizione *FokI* (Carroll D., 2008; Cathomen e Joung, 2008). Due matrici zinc finger sono state progettate per riconoscere sequenze bersaglio nel genoma (tipicamente ogni 9-12 bp) che sono separate da una sequenza spacer (tipicamente 5-7 bp). Il legame delle matrici zinc finger al target permette a *FokI* di dimerizzare e creare una rottura nel doppio filamento all'interno dello spacer. Si è pensato che le matrici zinc finger potrebbero essere sostituite con il dominio di riconoscimento del DNA di TALEs per creare TALENs che riconoscano e uniscano DNA targets (Figura 13). Per valutare la funzione TALEN, è stato adattato un saggio di lievito in cui l'attività *LacZ* serve come un indicatore di scissione del DNA (Townsend J. A. et al., 2009). In questo saggio, un plasmide target e un plasmide di espressione TALEN erano messi insieme

accoppiati nella stessa cellula. Il plasmide target ha un gene reporter *lacZ* con una sequenza codificante di 125-bp di duplicazione. La duplicazione fiancheggia il sito bersaglio TALEN. Quando un doppio filamento di DNA rotto si presenta in un sito target, viene riparato attraverso l'annealing di singoli filamenti tra le sequenze ripetute, creando un gene funzionale *lacZ* la cui espressione può essere misurata mediante saggi standard.

In primo luogo sono stati utilizzati due TALEs ben caratterizzati, vale a dire AvrBs3 dal patogeno del pepe *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria e PthXo1 dal patogeno del riso *X. oryzae* pv. *oryzae* (Bonas U. *et al.*, 1989; Yang *et al.*, 2006). Entrambe i geni codificanti TALE hanno un frammento di restrizione *Bam*HI che comprende la sequenza codificante per il dominio di ripetizione e 287 aa prima e 231 aa dopo. Assente dal frammento *Bam*HI è il dominio di attivazione trascrizionale TALE, che è stato sostituito con una nucleasi monomericamente *Fok*I. Poiché i monomeri *Fok*I devono dimerizzare per legarsi, non era chiaro quale potesse essere la lunghezza appropriata dello spacer tra i due siti di riconoscimento del DNA. Per le ZFNs, in cui la matrice zinc finger è separata da *Fok*I da un linker di 4–7 amminoacidi, il tipico spacer tra i due siti di riconoscimento è di 5-7 bp. Poiché 235 amminoacidi separano il dominio di ripetizione da *Fok*I nei costrutti TALEN, è stato selezionato uno spacer di 15-bp per separare i due siti di riconoscimento, supponendo che un spacer più grande possa essere necessario per consentire a *Fok*I di dimerizzare. Come controllo positivo è stato utilizzato una nucleasi zinc finger ben caratterizzata con un dominio di legame al DNA derivato dal fattore di trascrizione del topo Zif268 (Porteus e Baltimore, 2003). Come controlli negativi, i domini TALE furono fusi con un variante *Fok*I inattivo cataliticamente o testato contro DNA targets non conosciuti. Una robusta attività è stata osservata sia per il AvrBs3 che per le PthXo1 TALENs (Figura 14). L'attività dei PthXo1 TALEN si approssimava a quella del controllo positivo di ZFN.

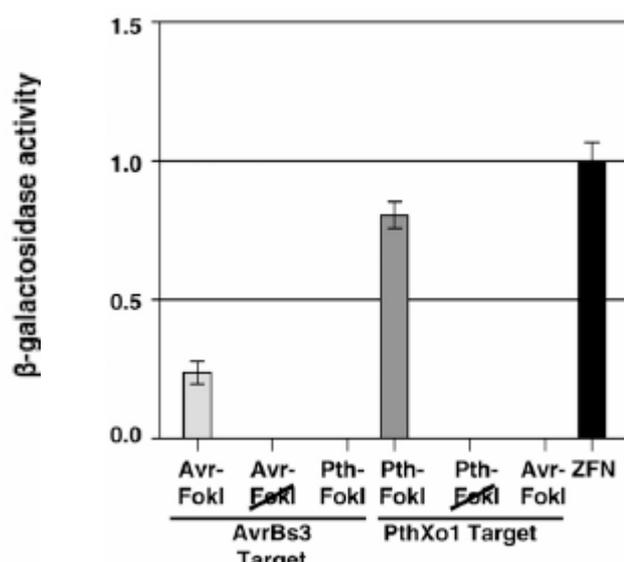


Figura 14. Attività delle TALENs costruite con TALEs AvrBs3 e PthXo1. Michelle *et al.*, 2010.

E' stata poi variata la distanza tra i siti di legame TALE (11 varianti di lunghezza tra 12 e 30 bp) per identificare le lunghezze degli spacer che consentano a *FokI* di dimerizzare più efficacemente (**Figura 15**). Entrambi gli enzimi mostravano due spacer di lunghezza ottimale: uno a 15 bp e l'altro a 21 bp (AvrBs3) o 24 bp (PthXo1). Per PthXo1, l'attività osservata per tutte le lunghezze di spacer testate era di 13 bp e più lunghi. Alcune lunghezze degli spacers per AvrBs3 non avevano mostrato alcuna attività, tuttavia, suggerisce che la lunghezza dello spacer è critica per alcuni TALENs.

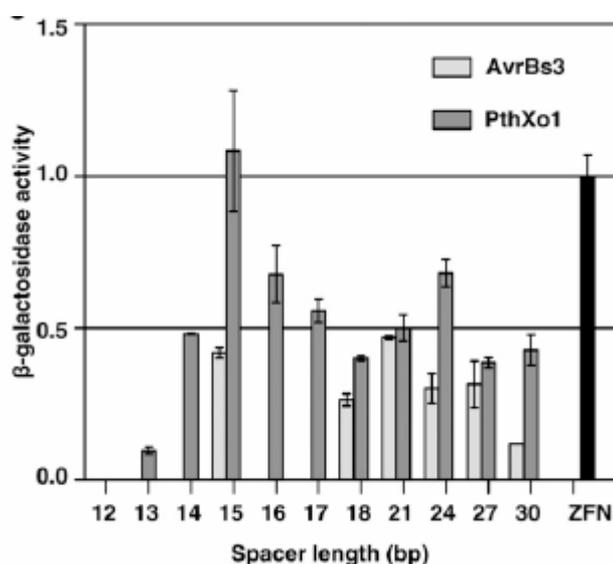


Figura 15. Attività di AvrBs3 e PthXo1 TALENs sui targets con differenti lunghezze di spacer. Michelle *et al.*, 2010

Gli esperimenti eseguiti hanno testato l'attività di TALENs omodimerici, che legano due sequenze di riconoscimento identiche poste in opposizione ai lati dello spacer. Dato che i siti palindromi siano improbabilmente presenti in natura in targets genomici, si è testato se i TALENs potrebbero funzionare come eterodimeri. I siti di riconoscimento AvrBs3 e PthXo1 furono posti su entrambi i lati di uno spacer di 15-bp (**Figura 16**). L'attività risultante dell'eterodimerico TALEN approssimava una media delle attività osservate con i due enzimi omodimerici.

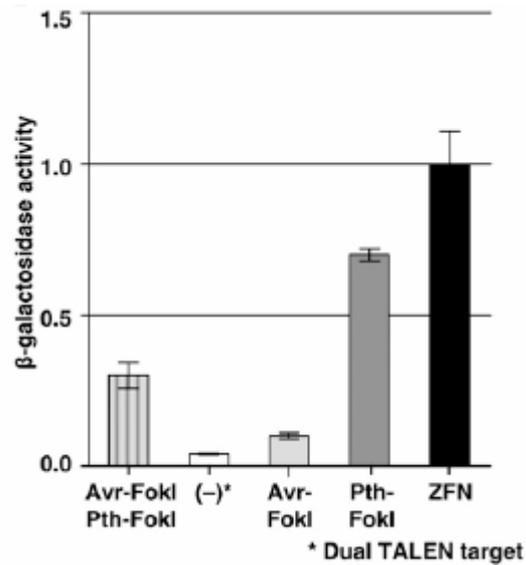


Figura 16. Funzione di unaTALEN eterodimero. Michelle *et al.*, 2010.

Per realizzare il potenziale di TALENs per la modificazione del genoma, sarà necessario progettarli per riconoscere nuove sequenze di DNA cromosomico. Casualmente i domini ripetuti assemblati sono stati mostrati per legare i targets di DNA previsti dal codice (Boch J. *et al.*, 2009).

Le TALENs sono molto promettenti per le applicazioni che richiedono sequenze specifiche di nucleasi. In particolare, la capacità di creare TALENs che riconoscano nuove sequenze targets selezionate arbitrariamente, suggerisce un potenziale per l'ingegneria delle TALENs per la modificazione del genoma target.

## **Conclusioni**

Per decenni la terapia genica per la cura della SCID-ADA si è evoluta non solo in modo significativo, ma ha raggiunto anche traguardi importanti. La scienza di base e la ricerca clinica hanno collaborato al fine di migliorare le opzioni terapeutiche per questa malattia altrimenti letale. La disponibilità delle diverse opzioni terapeutiche ha reso la scelta difficile. Tuttavia, il trapianto di midollo osseo da un donatore fratello HLA-identico rimane il trattamento di scelta.

La tecnologia di trasduzione ha permesso di utilizzare vettori più sicuri ed efficaci, ma nonostante ciò i metodi di modificazione del genoma umano hanno rivoluzionato la terapia genica con l'uso delle ZFNs. Questa nuova tecnologia permette di inserire un gene nuovo al posto di uno difettivo sostituendolo tramite i meccanismi di ricombinazione omologa e quindi modificando il genoma in maniera permanente in modo tale che il gene sia sotto il controllo di promotori naturali e non di quelli del vettore che lo trasporta, ovviando così a tutti gli svantaggi che comportano i vettori virali.

Le prospettive future per la cura della SCID-ADA sono quelle di valutare l'approccio migliore per curare questo disordine metabolico con gene targeting.

## Riferimenti bibliografici

- Abuchowski A., McCoy J.R., Palczuk N.C. *et al.* "Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase" *J Biol Chem* (1977) **252(11)**: 3582–6.
- Aisha V., Sauer and Alessandro Aiuti "New insights into the pathogenesis of adenosine deaminase severe combined immunodeficiency and progress in gene therapy" *Current opinion in Allergy and Clinical Immunology* (2009) **9**: 496-502.
- Aiuti A., Cattaneo F., Galimberti S., *et al.* "Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency" *N Engl J Med* (2009) **360**: 447-58.
- Aiuti A., Slavin S., Aker M *et al.* "Correction of SCID-ADA by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning" *Science* (2002) **296**: 2410–2413.
- Albuquerque W., Gaspar H.B. "Bilateral sensorineural deafness in adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency" *J Pediatr* (2004) **144(2)**: 278–80.
- Anderson W.F., Blaese R.M., Culver K. "The ADA human gene therapy clinical protocol: points to consider response with clinical protocol" *Hum Gene Ther* (1990) **1**: 331-362.
- Antoine C., Muller S., Cant A. *et al.* "Long-term survival and transplantation of haemopoietic stem cells for immunodeficiencies: report of the European experience 1968-99" *Lancet* (2003) **361(9357)**:553–60.
- Apasov S.G., Blackburn M.R., Kellems R.E. *et al.* "Adenosine deaminase deficiency increases thymic apoptosis and causes defective T cell receptor signalling" *J Clin Invest* (2001) **108(1)**:131–41.
- Avery O.T., MacLeod C.M., McCarty M. "Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Inductions of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III" *J Exp Med* (1979) **149**: 297–326.
- Benveniste P., Zhu W., Cohen A. "Interference with thymocyte differentiation by an inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase" *J Immunol* (1995) **155(2)**: 536–44.
- Blackburn M.R., Kellems R.E. "Adenosine deaminase deficiency: metabolic basis of immune deficiency and pulmonary inflammation" *Adv Immunol* (2005) **86**: 1–41.
- Blaese R.M., Culver K.W., Chang L. *et al.* "Treatment of severe combined immunodeficiency disease (SCID) due to adenosine deaminase deficiency with CD34+ selected autologous peripheral blood cells transduced with a human ADA gene" *Human Gene Ther* (1993) **4**: 521-527.
- Blaese R.M., Culver K.W., Miller A.D. *et al.* "T lymphocyte-directed gene therapy for SCID-ADA: initial trial results after 4 years" *Science* (1995) **270**: 475–80.
- Boch, J., H. Scholze S., Schornack A., Landgraf S., Hahn *et al.* "Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors" *Science* (2009) **326**: 1509–1512.

- Bogdanove A. J., S. Schornack and T. Lahaye “TAL effectors: finding plant genes for disease and defense” *Curr. Opin. Plant Biol.* (2010) **13**: 394–401.
- Bollinger M.E., Arredondo-Vega F.X., Santisteban I. *et al.* “Brief report: hepatic dysfunction as a complication of adenosine deaminase deficiency” *N Engl J Med* (1996) **334(21)**:1367–71.
- Bonas U., R. E. Stall and B. Staskawicz, “Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*” *Mol. Gen. Genet.* (1989) **218**: 127–136.
- Booth C., Hershfield M., Notarangelo L. *et al.* “Management options for adenosine deaminase deficiency; proceedings of the EBMT satellite workshop (Hamburg, March 2006)” *Clin Immunol* (2007) **123(2)**:139–47.
- Bordignon C., Notarangelo L.D., Nobili N. *et al.* “Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA- immunodeficient patients” *Science* (1995) **270(5235)**: 470–5.
- Brenner M.K., Rill D.R., Holladay M.S. *et al.* “Gene marking to determine whether autologous marrow infusion restores longterm haemopoiesis in cancer patients” *Lancet* (1993) **342**: 1134–1137.
- Buckley R.H. *et al.* “Hematopoietic stemcell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency” *N Engl J Med* (1999) **340**: 508-516, PubMed: 10021471.
- Buckley R.H. *Annu. Rev. Immunol.* (2004) **22**: 625–655.
- Candotti F., Notarangelo L. D., Giliani S. *et al.* “Approccio genetico e molecolare alla diagnosi delle immunodeficienze X-recessive” *Prospettive in Pediatria* (1992) **22**: 57-72.
- Carbonaro D.A, Jin X., Cotoi D. *et al.* “Neonatal bone marrow transplantation of ADA-deficient SCID mice results in immunologic reconstitution despite low levels of engraftment and an absence of selective donor T lymphoid expansion” *Blood* (2008) **111(12)**: 5745–54.
- Carbonaro D.A., Jin X., Petersen D., *et al.* “In vivo transduction by intravenous injection of a lentiviral vector expressing human ADA into neonatal ADA gene knockout mice: a novel form of enzyme replacement therapy for ADA deficiency” *Mol Ther* (2006) **13**: 1110–1120.
- Carroll D. “Progress and prospects: zinc-finger nucleases as gene therapy agents” *Gene Ther.* (2008) **15**: 1463 1468.
- Cassani B., Mirolo M., Cattaneo F., *et al.* “Altered intracellular and extracellular signaling leads to impaired T-cell functions in SCID-ADA patients” *Blood* (2008) **111(8)**: 4209–19.
- Cathomen T. and J. K. Joung, “Zinc-finger nucleases: the next generation emerges” *Mol. Ther.* (2008) **16**: 1200–1207.
- Cavazzana-Calvo M., Hacein-Bey S., de Saint Basile G. *et al.* “Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease” *Science* (2000) **288**: 669–672.
- Cederbaum S.D., Kaitila I., Rimoin D.L. *et al.* “The chondro-osseous dysplasia of adenosine deaminase deficiency with severe combined immunodeficiency” *J Pediatr* (1976) **89(5)**:737–42.

- Cepko C. and Pear W. "Overview of the Retrovirus Transduction System" *Current Protocols in Molecular Biology*.(2001) **36**: 9.9.1–9.9.16.
- Chaffee S., Mary A., Stiehm E.R., Girault D., Fischer A., Hershfield M.S. "IgG antibody response to polyethylene glycol-modified adenosine deaminase in patients with adenosine deaminase deficiency" *J Clin Invest*. (1992) **89(5)**:1643-1651.
- Chan B., Wara D., Bastian J., *et al.* "Long-term efficacy of enzyme replacement therapy for adenosine deaminase (ADA)-deficient severe combined immunodeficiency (SCID)" *Clin Immunol*. (2005) **117(2)**: 133-143.
- Chang Z.Y., Nygaard P., Chinault A.C. and Kellems R.E. "Deduced amino acid sequence of *Escherichia coli* adenosine deaminase reveals evolutionarily conserved amino acid residues: Implications of catalytic function" *Biochemistry* (1991) **30**: 2273-2280.
- Chatila T., Wong R., Miller R. & Geha R.S. "An immunodeficiency characterized by defective signal transduction in T lymphocytes" *N. Engl. J Med*. (1989) **320**: 696-702.
- Cline M.J. "Perspectives for gene therapy: inserting new genetic information into mammalian cells by physical techniques and viral vectors" *Pharmacol Ther* (1985) **29**: 69–92.
- Davis S., Abuchowski A., Park Y.K. *et al.* "Alteration of the circulating life and antigenic properties of bovine adenosine deaminase in mice by attachment of polyethylene glycol" *Clin Exp Immunol* (1981) **46**: 649–52.
- Deisseroth A.B., Zu Z., Claxton D. *et al.* "Genetic marking shows that cells present in autologous transplants of chronic myelogenous leukemia (CML) contribute to relapse after autologous bone marrow in CML" *Blood* (1994) **83**: 3068–3076.
- Dunbar C.E., Cottler-Fox M., O'Shaughnessy J.A. *et al.* "Retrovirally marked CD34-enriched peripheral blood and bone marrow cells contribute to long-term engraftment after autologous transplantation" *Blood* (1995) **85**: 3048–3057.
- Fajardo-Sanchez E., Stricher F., Paques F., Isalan M. and Serrano L. "Computer design of obligate heterodimer meganucleases allows efficient cutting of custom DNA sequences" *Nucleic Acids Res*. (2008) **36**: 2163–2173.
- Falk R. "The gene in search of an identity" *Hum Genet* (1984) **68**:195–204.
- Ficara F., Superchi D.B., Hernandez R.J. *et al.* "IL-3 or IL-7 increases ex vivo gene transfer efficiency in SCID-ADA BM CD34<sup>+</sup> cells while maintaining in vivo lymphoid potential" *Mol Ther* (2004) **10**: 1096–1108.
- Fischer A. "Human primary immunodeficiency diseases" *Immunity* (2007), **27**: 835-45.
- Fischer A. "Primary T-cell immunodeficiency" *Current Opinion in Immunol*. (1993) **5**: 569-578.
- Fischer A., Hacein-Bey-Abina S. and Cavazzana-Calvo M. "20 years of gene therapy for SCID" *Nature immunology* (2010) volume 11 number 6.
- Friedmann T. "The future for gene therapy-a reevaluation" *Ann NY Acad Sci* (1976) **265**: 141–152.

- Friedmann T., Roblin R. "Gene therapy for human genetic disease" *Science* (1972) **175**: 949–955.
- Fulvio P., Arnalda L., Rosanna V., Evelina M., Umberta V., Katia T. e Alberto G.U. "Il trapianto prenatale e postnatale di cellule staminali ematopoietiche in bambini affetti da immunodeficienza primitiva" *Ann. Ist. Super. Sanità* (1999), **vol. 35**, n.2, pp. 315-328.
- Galetto R., P. Duchateau and F. Paques "Targeted approaches for gene therapy and the emergence of engineered meganucleases" *Expert Opin. Biol. Ther.* (2009) **9**: 1289–1303.
- Gangi-Peterson L., Sorscher D.H., Reynolds J.W. *et al.* "Nucleotide pool imbalance and adenosine deaminase deficiency induce alterations of N-region insertions during V(D)J recombination" *J Clin Invest* (1999) **103(6)**: 833–41.
- Gaspar H.B., Aiuti A., Porta F., Candotti F., Hershfield M.S. and Notarangelo L.D "How I treat ADA deficiency" *Blood*. (2009) **114**: 3524-3532.
- Gaspar H.B. "Bone marrow transplantation and alternatives for adenosine deaminase deficiency" *Immunol Allergy Clin North Am* (2010) **30**: 221-236.
- Gaspar H.B., Bjorkegren E., Parsley K. *et al.* "Successful reconstitution of immunity in SCID-ADA by stem cell gene therapy following cessation of PEG-ADA and use of mild preconditioning" *Mol Ther.* (2006) **14(4)**: 505-513.
- Gaspar H.B., Parsley K.L., Howe S. *et al.* "Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector" *Lancet* (2004) **364**: 2181–2187.
- Gelfand E.W. & Dosch H.M. "Diagnosis and classification of severe combined immunodeficiency diseases Birth Defect" (1983) **19**: 65-72.
- Giblett E.R, Anderson J.E. & Cohen. F. "Adenosine-deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity" *Lancet* (1972) **ii**: 1067-1069.
- Gottlieb M.S. "Pneumocystis pneumonia—Los Angeles. 1981" *Am J Public Health* (2006) **96**: 980–981; discussion 982–983.
- Griscelli C., Lisowska-Groszpiere B. & Mach. B. "Combined immunodeficiency with defective expression of MHC class II genes" *Immunodef. Rev.* (1989) **1**:135.
- Hacein-Bey-Abina S., Von Kalle C. Schmidt M. *et al.* "LMO2- associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1" *Science* (2003) **302**: 415–419.
- Hamer D.H., Smith K.D., Boyer S.H. *et al.* "SV40 recombinants carrying rabbit beta-globin gene coding sequences" *Cell* (1979) **17**: 725–735.
- Hershfield M.S. "Combined immune deficiencies due to purine enzyme defects" In: Stiehm E.R., Ochs H.D., Winkelstein J.A., eds. *Immunologic Disorders in Infants and Children*. Philadelphia, PA: Saunders; (2004) 480-504.
- Hershfield M.S. "New insights into adenosine-receptor-mediated immunosuppression and the role of adenosine in causing the immunodeficiency associated with adenosine deaminase deficiency" *Eur J Immunol* (2005) **35(1)**: 25–30.

- Hershfield M.S. “PEG-ADA replacement therapy for adenosine deaminase deficiency: an update after 8.5 years” *Clin Immunol Immunopathol* (1995) **76(3 Pt 2)**: S228–32.
- Hershfield M.S., Chaffee S., Sorensen R.U. “Enzyme replacement therapy with polyethylene glycol-adenosine deaminase in adenosine deaminase deficiency: overview and case reports of three patients, including two nowreceiving gene therapy” *Pediatr Res* (1993) **33(1 Suppl)**: S42–7.
- Hirschhorn R., Paageorgiou P.S., Kesarwala H.H. *et al.* “Amelioration of neurologic abnormalities after “enzyme replacement” in adenosine deaminase deficiency” *N Engl J Med* (1980) **303(7)**: 377–80.
- Honig M., Albert M.H., Schulz A. *et al.* “Patients with adenosine deaminase deficiency surviving after proceedings of the EBMT satellite workshop”(Hamburg, March 2006) *Clin Immunol.* (2007) **123(2)**:139-147.
- Hoogerbrugge P.M., van Beusechem V.W., Fischer A. *et al.* “Bone marrow gene transfer in three patients with adenosine deaminase deficiency” *Gene Ther* (1996) **3**: 179–83.
- Howe S.J., Mansour M.R., Schwarzwaelder K. *et al.* “Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients” *J Clin Invest* (2008) **118**: 3143–3150.
- Husain M., Grunebaum E., Naqvi A. *et al.* “Burkitt’s lymphoma in a patient with adenosine deaminase deficiency-severe combined immunodeficiency treated with polyethylene glycol-adenosine deaminase” *J Pediatr.* (2007) **151(1)**: 93-95.
- Hütter G. *et al.* “Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Celta 32 stem-cell transplantation” *N Engl J Med* (2009) **360**: 692-98.
- Jacobson S. G. *et al.* “Gene therapy for Leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations” *Arch Ophthalmol* (2012) **130**: 9-24.
- Kameoka J., Tanaka T., Nojima I., Schlossman S.F. and Morimoto C., “Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen CD26” *Science* (1993) **261**: 466-469.
- Karol R.A., Eng J. & Shearer W.T. “Imbalance in subsets of T lymphocytes in an inbred pedigree with Omenn’s syndrome” *Clin. Immunol. Immunop.* (1983) **27**: 412.
- Kaufman D.A., Hershfield M.S., Bocchini J.A., Moissidis I.J., Jeroudi M., Bahna S.L. “Cerebral lymphoma in an adenosine deaminase-deficient patient with severe combined immunodeficiency receiving polyethylene glycol-conjugated adenosine deaminase” *Pediatrics.* (2005) **116(6)**: e876- e879.
- Keeler C.E “Gene therapy” *J Hered* (1947) **38**: 294–298.
- Kim H.J., H. J. Lee, H. Kim, S. W. Cho and J. S. Kim “Targeted genome editing in human cells with zinc finger nucleases constructed via modular assembly” *Genome Res.* (2009) **19**: 1279–1288.
- Kohn D.B., Weinberg K.I., Nolta J.A. *et al.* “Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency” *Nat Med* (1995) **1(10)**: 1017–23.

- Lainka E., Hershfield M.S., Santisteban I. *et al.* “Polyethylene glycol-conjugated adenosine deaminase (ADA) therapy provides temporary immune reconstitution to a child with delayedonset ADA deficiency” *Clin Diagn Lab Immunol.* (2005) **12(17)**: 861-866.
- Lee N., Russell N., Ganeshaguru K., *et al.* “Mechanisms of deoxyadenosine toxicity in human lymphoid cells in vitro: relevance to the therapeutic use of inhibitors of adenosine deaminase” *Br J Haematol* (1984) **56(1)**: 107–19.
- Levine F., Friedmann T. “Gene therapy techniques” *Curr Opin Biotechnol* (1991) **2**: 840-844.
- Lollini P-L., De Giovanni C., Nanni P *Terapia genica*. Zanichelli, Bologna (2001).
- Lombardo A., Genovese P., Beausejour C.M. *et al.* “Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase defective lentiviral vector delivery” *Nat Biotechnol* (2007) **25**: 1298– 1306.
- Macchi P., Villa A., Giliani S., Sacco M.G., Frattini, A., Porta F. *et al.* “Mutations of JAK-3 gene in patients with autosomal severe combined immunodeficiency (SCID)” *Nature* (1995) **377**: 65-68.
- Maeder M. L., Thibodeau-Beganny S., Osiaik A., Wright D.A., Anthony R.M. *et al.* “Rapid “open-source” engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification” *Mol. Cell* (2008) **31**: 294–301.
- Malacarne F., Benicchi T., Notarangelo L.D. *et al.* “Reduced thymic output, increased spontaneous apoptosis and oligoclonal B cells in polyethylene glycol-adenosine deaminase-treated patients” *Eur J Immunol.* (2005) **35(11)**: 3376-3386.
- Mantei N., Boll W., Weissmann C. “Rabbit beta-globin mRNA production in mouse L cells transformed with cloned rabbit betaglobin chromosomal DNA” *Nature* (1979) **281**: 40–46.
- Market. M.L. “Purine nucleoside phosphorylase deficiency” *Immunodeficiency Rev.* (1991) **3**: 45-81.
- Mercola K.E., Cline M.J. “Sounding boards. The potentials of inserting new genetic information” *N Engl J Med* (1980) **303**: 1297–1300.
- Michelle C., Tomas C., Erin L. D., *et al.* “Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases” *Genetics* (2010) **186**: 757-761.
- Montini E., Cesana D., Schmidt M., *et al.* “The genotoxic potential of retroviral vectors is strongly modulated by vector design and integration site selection in a mouse model of HSC gene therapy” *J Clin Invest* (2009) **119**: 964–975.
- Moreno-Carranza B., Gentsch M., Stein S. *et al.* “Transgene optimization significantly improves SIN vector titers, gp91phox expression and reconstitution of superoxide production in X-CGD cells” *Gene Ther* (2009) **16**: 111–118.
- Morgan R.A., Dudley M.E., Wunderlich J.R. *et al.* “Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes” *Science* (2006) **314**: 126–129.
- Mortellaro A., Hernandez R.J., Guerrini M.M., *et al.* “Ex vivo gene therapy with lentiviral vectors rescues adenosine deaminase (ADA)-deficient mice and corrects their immune and metabolic defects” *Blood* (2006) **108**: 2979–2988.

- Moscou M. J. and A. J. Bogdanove “A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors” *Science* (2009) **326**: 1501.
- Mulligan R.C., Howard B.H., Berg P. “Synthesis of rabbit beta-globin in cultured monkey kidney cells following infection with a SV40 beta-globin recombinant genome” *Nature* (1979) **277**: 108–114.
- Nagata S., Taira H., Hall A. *et al.* “Synthesis in *E. coli* of a polypeptide with human leukocyte interferon activity” *Nature* (1980) **284**: 316–320.
- Nathwani A.C. *et al.* “Adenovirus –associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B” *N Engl J Med* (2011) **365**: 2357-65.
- Neville R. “Gene therapy and the ethics of genetic therapeutics” *Ann NY Acad Sci* (1976) **265**: 153–169.
- Noguchi, M. *et al.* “Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans cell” (1993) **73**: 147-157, PubMed: 8462096.
- Ochoa S. “Synthetic polynucleotides and the genetic code” *Proc Can Cancer Conf* (1963) **5**: 37–64.
- Porteus M. H. and D. Baltimore “Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells” *Science* (2003) **300**: 763.
- Puck J.M. *et al.* “The interleukin-2 receptor gamma chain maps to Xq13.1 and is mutated in X-linked severe combined immunodeficiency, SCIDX1” *Hum Mol Genet* 2 (1993) 1099-1104, PubMed: 8401490.
- Rill D.R., Santana V.M., Roberts W.M. *et al.* “Direct demonstration that autologous bone marrow transplantation for solid tumors can return a multiplicity of tumorigenic cells” *Blood* (1994) **84**: 380–383.
- Rogers M.H., Lwin R., Fairbanks L. *et al.* “Cognitive and behavioral abnormalities in adenosine deaminase deficient severe combined immunodeficiency” *J Pediatr* (2001) **139**(1): 44–50.
- Rogers M.H., Lwin R., Fairbanks L., Gerritsen B. and Gaspar H.B. “Cognitive and behavioral abnormalities in adenosine deaminase deficient severe combined immunodeficiency” *J Pediatr* (2001) **139**: 44-50.
- Romer P., S. Recht, T. Strauss, J. Elsaesser, S. Schornack *et al.* “Promoter elements of rice susceptibility genes are bound and activated by specific TAL effectors from the bacterial blight pathogen, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.” *New Phytol.* (2010) (in press).
- Ryser M.F., Roesler J., Gentsch M. *et al.* “Gene therapy for chronic granulomatous disease” *Expert Opin Biol Ther* (2007) **7**: 1799–1809.
- Somia N., Verma I.M. “Gene therapy: trials and tribulations” *Nat Rev Genet* (2000) **1**: 91-99.
- Terheggen H.G., Lowenthal A., Lavinha F. *et al.* “Unsuccessful trial of gene replacement in arginase deficiency” *Z Kinderheilkd* (1975) **119**: 1–3.

- Titman P., Pink E., Skucek E. *et al.* “Cognitive and behavioral abnormalities in children after hematopoietic stem cell transplantation for severe congenital immunodeficiencies” *Blood* (2008) **112(9)**:3907–13.
- Townsend J. A., D. A. Wright, R. J. Winfrey, F. Fu., M. L. Maeder *et al.* “High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases” *Nature* (2009) **459**: 442–445.
- Turner C.P., Seli M., Ment L. *et al.* “A1 adenosine receptors mediate hypoxia-induced ventriculomegaly” *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) **100(20)**: 11718–22.
- Urnov F. D., Miller J. C., Lee Y. L., Beausejour C. M., Rock J. M. *et al.* “Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases” *Nature* (2005) **435**: 646–651.
- Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W. *et al.* “The sequence of the human genome” *Science* (2001) **291**: 1304–1351.
- Verma I.M., Somia N. “Gene Therapy: promises, problems and prospects” *Nature* (1999) **389**: 239-242.
- Wassem Q.H., Bobby G. and Adrian j. “Thrasher Gene therapy for severe combined immune deficiency” vol. 6; Issue 13; 2 July 2004 Cambridge University Press.
- Watson J.D., Crick F.H. “Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid” *Nature* (1953a) **171**: 964–967.
- Watson J.D., Crick F.H. “Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid” *Nature* (1953b) **171**: 737–738.
- Weiling F. “Historical study: Johann Gregor Mendel 1822– 1884” *Am J Med Genet* (1991) **40**: 1–25; discussion 26.
- Williams D.A. “Gene therapy continue to mature and to face challenges” *Mol Ther* (2009) **17**: 1305-6.
- Williamson B. “Gene therapy” *Nature* (1982) **298**: 416–418.
- Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J. *et al.* “Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells” *Nature* (1997) **385**: 810–813.
- Wilson D. I.C., Rudolph F.B. and Quijcho F.A. “Atomic structure of adenosine deaminase complexed with a transition-state analog: Understanding catalysis and immunodeficiency mutations” *Science* (1991) **252**: 1278-1284.
- Yang B., A. Sugio and F. F. White “Os8N3 is a host disease susceptibility gene for bacterial blight of rice” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2006) **103**: 10503–10508.