



**L'esperto
risponde**

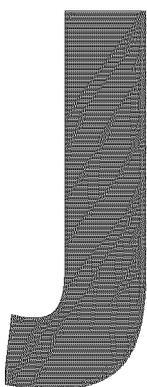
alle domande
dei lettori
sulle malattie
rare
all'indirizzo
[http://forum.
corriere.it/
malattie-rare](http://forum.corriere.it/malattie-rare)

Prima si poteva usare solo per «aggiungere» un gene sano per fare il lavoro di uno difettoso o mancante. Ora si può anche correggere, in laboratorio e pure direttamente nell'uomo, una sequenza di Dna difettosa. Le prospettive sono notevoli ma non mancano i timori e i dubbi etici

Negli Stati Uniti i bio-hacker testano su se stessi la manipolazione genetica. Una fuga in avanti pericolosa che rischia di mettere in ombra i progressi scientifici ottenuti sul campo: dalle tecniche classiche di correzione fino alle più recenti e promettenti metodiche applicate «in vitro» e «in vivo»

Taglia&cuci del Dna

Purché nelle mani giuste



Josiah Zayner è un bio-hacker di se stesso: sta cercando di manipolare il suo Dna per avere muscoli più potenti.

È il primo ad aver utilizzato la nuovissima tecnica di «taglia e cuci» del genoma, in sigla *Crispr-Cas9*, per modificare i suoi geni: l'ottobre scorso, in diretta su Internet, si è iniettato nel braccio destro quella che oggi si chiama *DIY (do-it-yourself) therapy*: una terapia fai-da-te.

Manie di protagonismo? Scienza d'avanguardia? Interessi commerciali?

Lui, americano di 36 anni, specializzato in biologia molecolare e biofisica (ha lavorato alla Nasa per portare la vita su Marte) dice di voler creare un mondo in cui tutti possono sperimentare queste nuove tecniche. Nel frattempo Zayner ha anche fondato un'azienda, produttrice di kit che permettono di manipolare geni, al momento di microbi e lieviti, per renderli fluorescenti (si veda box sopra).

Ma le prospettive sono infinite: secondo Zayner, in futuro, si potrebbero manipolare i fiori del proprio giardino,

per esempio, produrre uno yogurt con particolari microrganismi, oppure per fare il pane o la birra. E infine, perché no, anche per modificare le caratteristiche del proprio organismo (vediamo se lui ci riesce, ma al momento non sembra crederci troppo).

«Attenzione agli show. Queste fughe in avanti sugli ipotetici utilizzi di queste tecniche rischiano di essere dannose per la ricerca — sottolinea Carlo Alberto Redi, genetista a Pavia e Accademico dei Lincei —. Perché creano disorientamento nell'opinione pubblica e spaventano i decisori politici».

Non a caso un recente commento sulla rivista *Nature* ricorda come nella regione tedesca della Baviera, memore degli esperimenti nazisti, le tecniche *DIY* sono bandite, e questo preoccupa perché potrebbe rendere la Germania meno attrattiva per chi vuole fare ricerca in questo settore e per gli investitori che vedono nella biologia un business.

La ricerca, invece, deve continuare e, in tutto il mondo, ci sono scienziati seri che lavorano e credono nell'*editing* del Dna, con un obiettivo principale: quello di curare le malattie nell'uomo (anche se queste tecnologie possono essere sfruttate in altri settori come l'agricoltura o l'allevamento).

«Editing del Dna significa modificare parti del nostro patrimonio genetico con grande precisione (è questa la parola d'ordine, ndr) — spiega Luigi Naldini Direttore dell'Istituto Telethon per la Terapia genica (Tiget) al San

Raffaele di Milano e docente all'Università Vita e Salute —. Significa poter fare due cose: una è trovare e distruggere un gene di malattia e basta, (e questo non è possibile con la terapia genica classica, che permette soltanto l'«aggiunta» di geni), l'altra è quella di identificarlo e sostituirlo con la copia sana».

Ma come si fa l'editing? Ci sono tre tecniche (la terza è spiegata nel box a sinistra).

La più «vecchia» si chiama *zinc finger* (dita di zinco): queste dita, fatte di materiale genetico, sono capaci di identificare con precisione, nel patrimonio genetico di un individuo, la sequenza di Dna, cioè il gene, responsabile di malattia e di «tagliarlo».

«La tecnica — spiega Naldini — è stata utilizzata con successo in pazienti con infezione da virus dell'Aids. Nei linfociti (cellule del sistema immunitario, ndr) di queste persone è stato possibile eliminare il gene del recettore che permette al virus Hiv di infettare le cellule umane».

In questo caso la metodica è stata applicata in laboratorio (si dice *ex vivo*) su cellule (i linfociti) prelevate dal paziente e poi iniettate di nuovo nel paziente stesso.

Ma lo *zinc finger* può essere utilizzato anche *in vivo*, direttamente sul malato. È quello che è successo a Brian Madeux, un uomo di 44 anni affetto da sindrome di Hunter. Questa è una malattia genetica rara, chiamata anche *mucopolisaccaridosi di tipo 6*, che comporta un accumulo di prodotti tossici nella cellu-

le con conseguenti danni a diversi organi. I medici dell'Ucsf Benioff Children's Hospital di Oakland (California) hanno iniettato a Madeux un complesso contenente sia le dita di zinco sia il gene da sostituire. Ora si attendono i risultati a distanza di tempo.

«L'editing è indispensabile per certe malattie dove non si può aggiungere un gene sano a quello malato come accade con la terapia genica, ma occorre proprio inserire il gene sano in una posizione ben precisa nel Dna in modo che si esprima fisiologicamente — commenta Naldini —. È il caso di due immunodeficienze, malattie rare nelle quali il sistema di difesa immunitario è alterato: si tratta dell'immunodeficienza legata al cromosoma X e dell'immunodeficienza da *iperIgM* (le IgM sono un particolare tipo di anticorpi, ndr)».

Poi c'è la metodica di editing più recente, venuta alla ribalta nel 2012, il *Crispr-Cas9*, appunto.

In questo caso la «guida» per arrivare al gene non è uno *zinc finger*, ma un Rna, materiale nucleico che riconosce il gene, mentre l'enzima che poi lo taglia è il Cas9.

È una tecnica facile, poco costosa, ma ancora imprecisa. Ecco perché sono in corso numerosi esperimenti per valutarne le potenzialità, come ci informano i lavori pubblicati l'anno scorso sulle più importanti riviste scientifiche.

Ricerche che sono state condotte soprattutto su embrioni in laboratorio (non in vivo come ha fatto Josiah Zay-

ner), con l'idea di verificare se questa tecnica non solo può permettere di curare malattie genetiche di cui l'embrione è portatore, ma anche di impedire che vengano trasmesse alle generazioni successive.

Ecco allora che, nell'agosto scorso, la rivista Nature ha dato conto di un esperimento, condotto negli Usa con il metodo Crispr-Cas9, su embrioni umani per curare una malattia genetica del cuore: la cardiomiopatia ipertrofica,

che provoca scompenso di cuore ed è determinata dall'alterazione di un singolo gene. Risultato: tutte le cellule dell'embrione trattate sono «guarite», cioè non presentavano più il gene di malattia.

E in ottobre un'équipe cinese, sempre con Crispr-Cas9 sugli embrioni, è riuscita a correggere mutazioni puntiformi del Dna (che interessano cioè una singola base, una singola lettera del Dna) che provocano una malattia recessiva, la beta-talassemia

(che provoca una grave anemia): si chiama *chemical surgery*.

Fin qui si tratta di esperimenti di laboratorio su embrioni che, comunque, non potevano essere impiantati e dare origine a una nuova vita.

Poi ci sono anche studi su animali. Nel dicembre scorso ricercatori americani dell'Università di Durham hanno sperimentato una nuova modalità di somministrazione della tecnica sul topo «Bethoven»: un topo sordo per

il difetto di un gene (il Tmc1) che colpisce anche l'uomo. Gli scienziati hanno inglobato il complesso Crispr-Cas9 in sfere lipidiche che hanno iniettato direttamente nell'orecchio interno dell'animale, riducendone il grado di sordità. E per quest'anno si prevede di cominciare a utilizzare la metodica sull'uomo per combattere il papillomavirus, responsabile di tumori come quello alla cervice uterina, e di somministrarla con un gel topico.

Adriana Bazzi
 © RIPRODUZIONE RISERVATA

Lo studio

Ci sono anticorpi che sabotano le forbici molecolari

Ci potrebbero essere sabotatori della tecnica di editing con il metodo Crispr-Cas9, fabbricati dall'organismo umano stesso. Il problema sta nel Cas9, come ha appena dimostrato una ricerca americana condotta alla Stanford University in California (in pre-pubblicazione sul sito bioRxiv e non ancora valutata dai revisori). Il Cas9 è un enzima che viene prodotto da batteri (infatti la scoperta della tecnica si è basata proprio sull'osservazione di come si

comportano alcuni batteri dello yogurt) e, nel caso dell'editing, serve per tagliare il Dna in punti precisi. Adesso, però, i ricercatori hanno evidenziato, nel sangue di una quarantina di persone, anticorpi contro questo enzima prodotti da batteri come lo *Staphylococcus aureus* e lo *Streptococcus pyogenes* che vivono normalmente nell'organismo umano. Questi anticorpi potrebbero neutralizzare il Cas9 nel Crispr-Cas9.

A.Bz.



Il caso

Un americano di 36 anni, Josiah Zayner, in diretta su internet si è iniettato una terapia genica «fai da te» per avere muscoli più potenti



Le «dita di zinco»

Zinc finger è la procedura più vecchia per l'editing e può identificare con precisione il gene responsabile di una malattia ed eliminarlo

«Talens»

Si chiama Talens ed è una tecnica di editing del Dna che non prevede la manipolazione delle cellule del paziente in laboratorio, ma usa quelle di un donatore. e si basa, per individuare il gene da correggere, sulla tecnica zinc finger. È stata sperimentata per la prima volta in Gran Bretagna nel 2015 su Layla, una bambina di un anno affetta da una leucemia linfoblastica acuta

Il metodo Crispr-Cas9 è stato sperimentato in laboratorio su embrioni umani che, comunque, non potevano essere impiantati e dare origine a una nuova vita. Però sono partiti anche studi su animali e quest'anno sull'uomo

I vettori

Quando i virus diventano «chauffeur»

Non ha avuto fortuna Jesse Gelsinger. Aveva una malattia rara del fegato chiamata deficit di ornitina transcarbamilasi, un enzima la cui carenza provoca un accumulo di prodotti di scarto del metabolismo delle proteine nelle cellule, con danni agli organi e prognosi mortale.

Nel 1999 all'Università americana della Pennsylvania, i medici hanno provato su di lui un'innovativa terapia genica: gli hanno iniettato il gene, capace di produrre l'enzima, trasportato da virus. Ma le cose sono andate storte: i virus erano troppi e così, a diciotto anni, è morto per una reazione immunitaria incontrollata contro questi ultimi.

In seguito la terapia genica sull'uomo ha subito una battuta di arresto, ma i ricercatori non si sono fermati (del resto anche i trapianti d'organo, all'inizio, hanno avuto esiti negativi, ma oggi salvano milioni di vite). E ora sta vivendo un nuovo Rinascimento.

In tutto il mondo sono almeno duecento i pazienti trattati con questa tecnica e buoni risultati, per lo più persone affette da malattie genetiche rare come l'Ada Scid, una grave immunodeficienza; la leucodistrofia metacromatica, una malattia neurodegenerativa; la talassemia, un'alterazione dei globuli rossi che provoca grave anemia e l'amaurosi di Leber che determina cecità.

«La terapia genica — spiega Andrea Ballabio, direttore del Tigem, il Telethon Institute of Genetic Medicine di Napoli e professore di Genetica medica all'università Federico II di Napoli — usa geni come farmaci. Le copie sintetiche del gene sano vengono veicolate da virus di vario tipo, che hanno la capacità di infettare le cellule umane».

A differenza dell'editing, che riscrive il Dna, con la terapia genica, utilizzata per curare malattie cosiddette recessive (si manifestano quando

entrambi i geni sono alterati), non è necessario sostituire il gene difettoso colpevole di far perdere alla cellula una certa funzione (per esempio la produzione di globuli rossi normali come avviene nella talassemia), ma basta aggiungere una copia di quello sano.

«La tecnica — continua Ballabio — può essere utilizzata sia "ex vivo", cioè in laboratorio su cellule prelevate dal paziente, oppure "in vivo", iniettando i vettori virali con il gene direttamente nel malato». Nei due casi si usano virus diversi: nel primo, lentivirus, parenti dell'Hiv che provoca l'Aids, ma resi inoffensivi; nel secondo, virus simili agli Adenovirus che provocano il raffreddore.

La tecnica ex vivo viene sfruttata, per esempio, nell'Ada Scid per modificare i precursori dei globuli bianchi e proprio quest'anno il farmaco (messo a punto al San Raffaele di Milano) ha ottenuto l'autorizzazione al commer-

cio. Oppure per la cura di tumori come nel caso della Car-T cell therapy (si veda articolo sotto). O infine nell'epidermolisi bollosa, un altro successo italiano: lembi di pelle geneticamente modificata, costruiti all'Università di Modena Reggio Emilia nei laboratori diretti da Michele De Luca sono stati trapiantati, l'anno scorso in Germania, su un bambino di sette anni, affetto da questa malattia che provoca il distacco della cute.

Con la tecnica «in vivo», invece, il complesso virus-gene viene iniettato nel circolo sanguigno (a Napoli si sta sperimentando nella mucopolisaccaridosi di tipo 6, che comporta un accumulo di prodotti tossici nell'organismo con danni a vari organi) o direttamente nel tessuto da curare, come nel caso della retina. Negli Usa è appena stata approvata una terapia di questo tipo, per la cura di una forma di cecità ereditaria. Una cura biotech, la più cara di sempre: costo, 850 mila dollari.

A.Bz.

© RIPRODUZIONE RISERVATA

La storia di Emily salvata dalle super cellule immunitarie

Emily Whitehead, una bimba americana di dodici anni, è una «testimone vivente»: così l'ha definita la rivista *Nature* nella sua classifica dei dieci personaggi famosi del 2017.

A cinque anni è stata colpita da una forma di leucemia linfoblastica acuta. Prima è stata sottoposta a una chemioterapia, come prevedono le linee-guida standard, poi a un trapianto di midollo, ma la malattia si era ripresentata.

Così, nel 2012, ha fatto da «cavia» a un trattamento sperimentale al Children's Hospital di Philadelphia, il primo al mondo: i medici le hanno prelevato cellule immunitarie

(i linfociti T), le hanno modificate geneticamente, inserendo un gene capace di riconoscere uno specifico antigene presente sulla superficie delle cellule tumorali (il CD19) e poi le hanno reinfuso i linfociti così modificati.

Questi linfociti, chiamati Car-T (*Chimeric antigen receptor - T*) si sono dimostrati in grado di aggredire e an-

nientare il tumore. Da allora Emily ha condotto una battaglia, con la mamma Kari e il papà Tom, all'Fda, l'ente americano per il controllo dei farmaci, perché questa terapia (tisagenlecleucel) fosse approvata, come è poi avvenuto negli ultimi mesi.

Più recentemente ha avuto il semaforo verde, è stata approvata, sempre negli Usa, una terapia analoga, per il trattamento dei linfomi. Therapie, comunque, ad alto costo: 475 mila dollari la prima, 373 mila dollari la seconda. C'è da dire, però, che si somministrano una tantum.

A.Bz.

© RIPRODUZIONE RISERVATA



L'esperto risponde

alle domande dei lettori sulle malattie rare all'indirizzo <http://forum.corriere.it/malattie-rare>

Sono **due** le vie attraverso le quali si può modificare il Dna umano

EDITING

È un metodo di riscrittura del Dna che permette di intercettare con precisione il gene malato e di distruggerlo oppure di sostituirlo con il gene sano attraverso tre tecniche

- **Crispr-Cas9:** è la più nuova; usa l'Rna per identificare i geni
- **Zinc finger:** usa, appunto, «dita di zinco», fatte di materiale genetico, per individuare i geni
- **Talens:** utilizza la tecnica zinc finger, ma su cellule di donatore e non su quelle del paziente

Il sistema Crispr-Cas9 è una specie di bisturi universale, capace di tagliare il Dna delle cellule, umane e non, in punti precisi

L'obiettivo è quello di eliminare geni difettosi (il gene è un frammento di Dna) oppure di tagliarli e sostituirli con geni sani

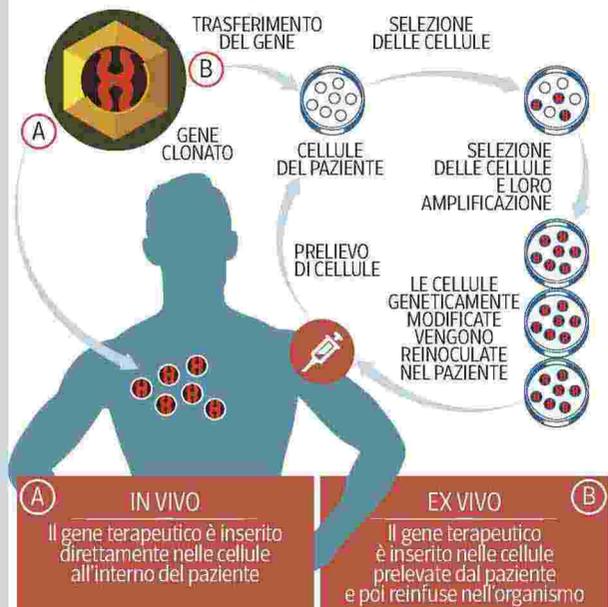
Il CRISPR è un frammento di Rna che funziona da guida: viene costruito apposta in modo che sia complementare al pezzo di Dna che si vuole andare a colpire. Agganciato al CRISPR c'è un enzima, chiamato Cas9: è lui che taglia il Dna

La rottura del Dna provoca, in genere, mutazioni che inattivano il gene, ma, se si devono curare malattie genetiche, è anche possibile introdurre nuove sequenze



TERAPIA GENICA CLASSICA

Permette l'aggiunta, al patrimonio genetico dell'individuo, di geni sani che si posizionano dove capita



Fonte: European Society of Gene and Cell Therapy; Addgene

Corriere della Sera / Mirco Tangherlini

Malattiarare

Sperimentazione su 15 bambini colpiti da Sma1

La sua sorellina non ce l'ha fatta, ma lei, Evelyn si: entrambe soffrivano di una rara malattia, la Sma1, un'atrofia muscolare spinale, provocata da un difetto genetico, che porta a progressiva debolezza dei muscoli, compresi quelli respiratori, e alla morte nel giro di due anni. Ma a Evelyn ricercatori americani dell'Ohio hanno provato a somministrarle una terapia genica sperimentale che si basa sulla iniezione endovenosa del gene sano, veicolato da un virus

chiamato Aav (cioè adenovirus associato). Il gene è andato a correggere il difetto del Dna dei neuroni, passando la barriera ematoencefalica e arrivando al cervello. Per questa malattia esiste oggi un farmaco efficace che deve essere somministrato ogni mese. Si spera, invece, che questa terapia genica sia «una tantum». Evelyn è la prima di un gruppo di 15 bambini trattati allo stesso modo.

A.Bz.

In tutto il mondo sono almeno duecento i pazienti trattati con terapia genica in cui si usano virus modificati come vettori. La tecnica è usata per lo più nella cura di malattie genetiche rare come l'Ada Scid, una grave immunodeficienza; la leucodistrofia metacromatica una malattia neurodegenerativa; la talassemia, un'alterazione dei globuli rossi che provoca grave anemia e l'amaurosi di Leber che provoca cecità