

## TRASFERIMENTO GENICO: FINALITÀ TERAPEUTICHE IN EMATOLOGIA

**Lucio Luzzatto**

*Department of Human Genetics, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY 10021, USA*

Nella visione ematocentrica degli ematologi, la comprensione delle basi biologiche delle malattie del sangue è sempre stata almeno un passo più avanti rispetto alle altre specialità della medicina. Possiamo essere legittimamente orgogliosi del fatto che il termine “malattia molecolare” è stato coniato per l’anemia falciforme, e che l’emoglobina è stata la prima proteina oligomerica di cui si è risolta la struttura cristallografica. Inoltre, i geni globinici furono i primi geni umani ad essere clonati, e i polimorfismi evidenziabili a livello di DNA mediante l’uso di enzimi di restrizione furono scoperti analizzando questi geni.

Se queste primizie sono state importanti a livello di genetica e fisiopatologia molecolare, che cosa possiamo dire per quanto riguarda la capacità storica dell’ematologia ad utilizzare i progressi della biologia di base per sviluppare nuovi approcci terapeutici? In questo campo, abbiamo naturalmente luci ed ombre. Da un lato, l’anemia perniziosa è stata razionalmente debellata con la scoperta della vitamina B<sub>12</sub>; l’anemia della insufficienza renale cronica è stato il primo esempio di una malattia specifica controllata mediante l’uso di un fattore di crescita – l’eritropoietina ricombinante. D’altro canto, dobbiamo riconoscere che scarsi progressi sono stati compiuti nel trattamento della sferocitosi ereditaria da quando la splenectomia fu introdotta su base empirica; e il trattamento dell’anemia falciforme è tutt’altro che soddisfacente, malgrado la sua base molecolare sia nota sin dal 1956. In effetti, i primi veri passi avanti in questo campo sono stati l’idrossiurea e il trapianto di midollo allogenico, entrambi inizialmente introdotti in terapia con scopi completamente diversi.

Al momento attuale, una delle sfide più importanti alla nostra ambizione è di porre a disposizione dei malati ematologici i progressi della genetica molecolare e dell’ingegneria genetica: in altre parole, utilizzare il trasferimento genico per scopi terapeutici (Huber & Lazo, 1994; Culver, 1996; Jain, 1998). Gli ematologi dovrebbero essere pronti per questo compito. Infatti, le basi razionali per la correzione di una malattia ematologica ereditaria sono state poste da tempo in termini relativamente semplici, e possono essere sintetizzate nei punti seguenti:

1. Ottenere il gene normale in forma pura
2. Introdurre il gene nelle cellule staminali
3. Ottenere l’integrazione del gene in modo idoneo alla sua espressione persistente
4. Ricostituire l’emopoiesi con le cellule così trasdotte.

È opportuno considerare brevemente a che punto siamo nel superare queste tappe, e dove si sono presentati i problemi limitanti per l'adozione del trasferimento genico a scopo terapeutico.

1. L'identificazione ed il *clonaggio* di geni responsabili di malattie ereditarie si sono rivelati più semplici del previsto, grazie alla tecnologia della PCR ed al progetto genoma umano: in effetti, la maggior parte di questi geni sono oggi disponibili. Per contro, la delucidazione dei meccanismi di regolazione dei geni tessuto-specifici ha rivelato livelli multipli di complessità, soprattutto per geni, come quelli globinici, che hanno livelli estremamente elevati di espressione, e la cui espressione non è solo funzione del lignaggio cellulare, ma anche dello stadio ontogenetico dell'organismo. Che i geni per l' $\alpha$  e la  $\beta$  globina non sono geneticamente concatenati è stato chiaro sin dagli anni '60 (ben prima che fossero mappati a due diversi cromosomi). Da allora, una delle caratteristiche più interessanti del sistema è la perfetta stechiometria della sintesi delle catene  $\alpha$  e  $(\gamma + \beta + \delta)$ , che non può essere spiegata semplicemente da meccanismi che agiscono in *cis*. Questo quesito è reso ancora più affascinante dalla scoperta inattesa che la struttura fine del cluster genico dell' $\alpha$  globina (Higgs et al., 1998) è profondamente diversa da quello della  $\beta$  globina (Grosveld et al., 1998) sebbene entrambi abbiano in comune l'esistenza di una *locus control region* (LCR). È chiaro che, allo scopo di rendere efficace la terapia genica, capire in dettaglio i meccanismi di regolazione estremamente sofisticati che operano in questi complessi geni è altrettanto cruciale che conoscere la struttura dei geni stessi (Rivella & Sadelain, 1998). Da questo punto di vista è probabile che risulti più facile manipolare geni dalla regolazione più semplice, come quelli aventi livelli di espressione assai più modesta, con scarsa o nulla specificità di espressione (ad esempio, i cosiddetti *housekeeping genes*: Mason, 1998).

2. Per quanto riguarda l'introduzione di un gene nelle cellule bersaglio, la "*vettorologia*" si è sviluppata in molte direzioni diverse. Per le cellule emopoietiche, i retrovirus restano all'avanguardia. Dall'analisi della loro struttura sappiamo che spesso sono stati capaci di incorporare geni appartenenti alle cellule ospiti, il genoma delle quali mostra segni abbondanti di quanto spesso il trasferimento abbia avuto luogo in senso inverso: vale a dire, materiale genetico è stato reintrodotta dai retrovirus, che possono essere considerati dei professionisti del trasferimento genico. In effetti, da numerosi esperimenti *in vitro* e *in vivo* si è confermato che i retrovirus sono dotati di una elevata efficienza di trasduzione e di integrazione permanente. Nel nostro sforzo continuo di integrare biologia e medicina, non è sorprendente che siamo attratti dall'idea di adottare e adattare a fini terapeutici i prodotti di una così lunga storia evolutiva. Il genoma retrovirale è piccolo: perciò, in particolare nel caso dei geni globinici, una seria difficoltà fisica consiste nel comprimere nello spazio disponibile tutti gli elementi strutturali e regolativi necessari.

3. Malgrado le difficoltà alle quali si è accennato, in vari casi i primi due punti sono stati affrontati e risolti. Al contrario, ottenere *espressione continua* è spesso risultato problematico. Forse la sorpresa maggiore è stata non che l'integrazione non garantisce l'espressione, ma piuttosto che l'espressione può avvenire inizialmente, per poi spegnersi in seguito. In alcuni casi questo fenomeno indica un vero blocco trascrizionale nella cellula in cui il gene era inizialmente trascritto. Ma nel caso delle cellule emopoietiche, una possibilità probabilmente più comune è che cellule che esprimono il gene sono state rimpiazzate da cellule che non lo esprimono. In ogni caso, è chiaro che abbiamo bisogno di passi in avanti in questo senso. Un punto importante è comprendere se questo problema è meno severo per geni molto meno finemente regolati. Numerose forme di anemia emolitica congenita sono dovute alla deficienza negli eritrociti di uno degli enzimi della glicolisi o del metabolismo ossido-riduttivo: per la maggior parte di questi malattie emolitiche siamo ora giunti ad una buona conoscenza delle basi molecolari.

4. L'ultimo punto cruciale è la ricostituzione del sistema emopoietico da parte delle cellule trasdote. All'inizio degli anni '80, quando il trapianto di midollo progrediva rapidamente da esperimento piuttosto avventuroso a terapia standard per molte malattie ematologiche, poteva sembrare che il problema cellulare fosse più facile da risolvere del problema molecolare: in effetti, non è stato così. Sebbene migliaia di pazienti vivano da anni grazie ad un sistema linfo-emopoietico ricostituito da cellule staminali proprie o di un donatore, ancora non disponiamo di una metodologia attendibile di analisi delle cellule staminali che non sia il trapianto stesso. Inoltre, dal momento che le cellule staminali sono in numero limitato e si dividono piuttosto di rado, esse sono letteralmente bersagli elusivi per l'integrazione retrovirale. Al momento, possiamo identificare tre problemi tecnici collegati tra loro. (a) Ottenere un numero cospicuo di cellule staminali. (b) Mettere a punto un protocollo che consenta la massima frequenza di trasduzione senza compromettere le caratteristiche staminali delle cellule che vengono trasdote. (c) Selezionare *in vitro* o *in vivo* le cellule staminali trasdote. Da questo punto di vista, uno degli sviluppi recenti più vistosi è stata la introduzione di vettori basati su lentivirus. Diversamente dai retrovirus murini 'classici', i lentivirus hanno la capacità di attraversare la membrana nucleare, e perciò di raggiungere l'integrazione anche prima che la cellula abbia un ciclo di divisione. Se divenisse facile trasferire geni anche in poche cellule che siano veramente cellule staminali, possiamo immaginare che tutte le malattie genetiche curabili mediante trapianto allogenico di midollo dovrebbero essere ugualmente curabili mediante correzione genetica delle cellule staminali seguita da trapianto autologo di midollo.

Come esempio di questo tipo di terapia genetica verranno presentati dati *in vitro* ad *in vivo* inerenti ad uno studio pre-clinico della glucosio 6-fosfato deidrogenasi (G6PD). È ben noto che la enzimopenia G6PD (una delle più frequenti anomalie

genetiche in molte popolazioni, compresa quella Italiana) è spesso del tutto asintomatica e comunque clinicamente benigna. Tuttavia, alcune mutazioni della G6PD sono responsabili di forme di anemia emolitica cronica non-sferocitica che possono essere gravi e per le quali non esiste sinora un trattamento definitivo. Abbiamo trasdotto cellule di midollo osseo di topo con sopranatanti acellulari contenenti un alto titolo di vettori retrovirali (pseudotipati con la glicoproteina G del Virus della Stomatite Vesicolare), nei quali la trascrizione della G6PD umana (HG6PD) è promossa o dal LTR del virus murino MPSV, o da un promotore ibrido LTR-G6PD, che contiene una isola CpG tipica di geni *housekeeping*. L'integrazione di un gene perfettamente funzionante è stata dimostrata grazie alla espressione stabile (per oltre 18 mesi) di HG6PD nelle cellule di sangue periferico di topi che hanno ricevuto trapianti di cellule trasdotte, ed in topi che hanno ricevuto trapianti secondari (oltre 11 mesi). Il livello di espressione della HG6PD, misurato attraverso il dosaggio diretto dell'attività enzimatica, era dello stesso ordine di quello della G6PD endogena del topo. Con gli stessi vettori abbiamo anche trasdotto cellule staminali 'mobilizzate' ottenute da sangue periferico umano, che sono poi state trapiantate in topi NOD-SCID.

\* \* \*

Infine, è da notare che, sia nell'ematologia sia in altri settori, negli ultimi anni la direzione degli sforzi che mirano ad utilizzare il trasferimento genico a fini terapeutici ha avuto la tendenza a virare dalle malattie ereditarie verso quelle acquisite. E' chiaro che si tratta in generale di situazioni fondamentalmente diverse. Nel primo caso siamo di solito di fronte ad una condizione recessiva dovuta alla perdita della funzione di un determinato gene, ad esempio un difetto di un enzima o di un fattore della coagulazione: ci attendiamo pertanto che una correzione anche solo parziale può avere un impatto clinico importante. Nel secondo caso la situazione è assai variabile; ma per quanto riguarda le malattie neoplastiche ci troviamo di fronte specialmente nel caso di un tumore, ci si trova di fronte ad una popolazione di cellule nelle quali una o più mutazioni somatiche hanno prodotto un acquisto di funzione che produce il fenotipo maligno. Perciò, un intervento di correzione genetica che non si estenda al 100% delle cellule avrà quasi certamente, anche nel migliore dei casi, un effetto solo temporaneo; e dobbiamo ammettere che al momento attuale le tecniche di trasferimento genico *in vivo* non hanno un tale livello di efficienza. Ciò malgrado, sono in corso numerosi tentativi di utilizzare il trasferimento genico in modo ingegnoso come parte del trattamento delle leucemie e di tumori maligni. Un raro caso di successo già conseguito a livello clinico è il recente uso di cellule T geneticamente modificate che sono state utilizzate per controllare la ricaduta in leucemia mieloide cronica dopo trapianto allogenico, e poi eliminate mediante l'utilizzo di un appropriato farmaco quando insorge la minaccia di *graft-versus-host disease*.

## RINGRAZIAMENTI

Alcune parti di questo articolo sono liberamente tradotte, grazie alla cortesia del Dr Antonello Di Cristofano, da Luzzatto (1998a), che contiene ulteriori riferimenti bibliografici. Per i dati sullo studio della G6PD ringrazio i colleghi del mio laboratorio Ana Rovira, Maria De Angioletti, Olga Camacho Vanegas, Delong Liu, Vittorio Rosti, Humilidad Gallardo. Per anni di collaborazione e per la Fig. 1 ringrazio il Dr Michel Sadelain e il Dr Rosario Notaro.

## BIBLIOGRAFIA

- Bonini C, Ferrari G, Verzeletti S, Servida P, Zappone E, Ruggieri L, Ponzoni M, Rossini S, Mavilio F, Traversair C and Bordignon C. (1997). HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* **276**: 1719-1724.,
- Culver KW. (1996). Gene Therapy: A Primer for Physicians. MA Liebert, Inc., Larchmont, NY,
- Dranoff G. (1998). The use of gene transfer in cancer immunotherapy. *Forum* **8**: 357-364.,
- Grosveld F, de Boer E, Dillon N, Fraser P, Gribnau J, Milot E, Trimborn T and Wijgerde M. (1998).The dynamics of globin gene expression and gene therapy vectors. *Seminars in Hematology* **35**: 104-111.
- Higgs DR, Sharpe JA and Wood WG. (1998). Understanding  $\alpha$  globin gene expression: A step towards effective gene therapy. *Seminars in Hematology* **35**: 93-104.
- Huber BE and JS Lazo (eds), (1994). Gene Therapy for Neoplastic Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Volume 716.
- Jain KK. (1998). Textbook of Gene Therapy. Hogrefe & Huber Publishers, Seattle,
- Krause A Guo HF, Latouche JB, Tan C, Cheung NKV and Sadelain, M (1998). Antigen-dependent CD28 signaling selectively enhances survival and proliferation in genetically modified activated human primary T lymphocytes. *J Experimental Medicine* **188**: 619-626.
- Kwon ED, Hurwitz AA, Foster BA, Madias C, Feldhaus AL, Greenberg NM, Burg MB and Allison JP. (1997). Manipulation of T cell costimulatory and inhibitory signals for immunotherapy of prostate cancer. *PNAS* **94**: 8099-8103.
- Luzzatto L. (1998a) .From the genetic basis of blood disorders to gene transfer for the purpose of gene therapy. *Seminars in Hematology* **35**: 89-92.
- Luzzatto L. (1998b) .Introduction. *Forum* **8**: 324-327,

- Mason PJ (1998). Red cell enzyme deficiencies: From genetic basis to gene transfer. *Seminars in Hematology* **35**: 126-135
- Rivella S and Sadelain M. (1998). Genetic treatment of severe hemoglobinopathies: The combat against transgene variegation and transgene silencing. *Seminars in Hematology* **35**: 112-125.
- Ross HM, Weber LW, Wang S, Piskun G, Dyall R, Song P, Takechi Y, Nokolic-Zugic J, Houghton AN and Lewis JJ (1997). Priming for T-cell-mediated rejection of established tumors by cutaneous DNA immunization. *Clinical Cancer Research* **3**: 2191-2196.
- Szabolcs P, Gallardo HF, Ciocon DH, Sadelain M and Young JW. (1997). Retrovirally transduced human dendritic cells express a normal phenotype and potent T-cell stimulatory capacity. *Blood* **90**: 2160-2167.
- Zier KS, Gansbacher B (1996). IL-2 gene therapy of solid tumors: an approach for the prevention of signal transduction defects in T cells. *J Molecular Medicine* **74**: 127-134.

Fig. 1. Varietà di applicazioni possibili del trasferimento genico in cellule ematopoietiche per il trattamento di malattie diverse. I dischetti indicano schematicamente cellule staminali (\*) e cellule progenitrici in successione gerarchica. Le cellule bersaglio ideali variano in relazione agli scopi terapeutici ed a quali malattie intendiamo trattare. Ad esempio, il supplemento temporaneo di cellule mieloidi' si riferisce alla possibilità di proteggere da neutropenia pericolosa per un periodo limitato di tempo un paziente sottoposto a chemioterapia intensiva, mediante l'uso di cellule progenitrici relativamente mature rese resistenti al chemioterapico in questione (ad esempio, methotrexate) mediante trasferimento genico (ad esempio, della diidrofolato reduttasi).

**Tabella 1**

*Vari usi del trasferimento genico per ottimizzare la risposta immune nel trattamento di malattie neoplastiche*

<b>Obiettivo principale</b>	<b>Cellula bersaglio</b>	<b>Gene trasferito</b>	<b>Vettore</b>	<b>Stadio di avanzamento</b>	<b>Riferimento bibliografico</b>
Controllo della GVHD	Linfociti T	HSV-TK	Retrovirus	Clinico, positivo	Bonini et al., 1997
Ottimale presentazione dell'antigene	Cellule dendritiche	CD2	Retrovirus	Pre-clinico	Szabolcs et al., 1998
Stimolazione di azione citotossica	Cellule neoplastiche	IL-2	Retrovirus	Clinico, risultati dubbi	Zier & Gansbacher, 1996
		CD80	Lipofezione	Pre-clinico	Kwon et al, 1997
		MG-CSF	Retrovirus	Clinico	Dranoff, 1998
Attivazione immune ottimale	Linfociti T	CD28	Retrovirus	Pre-clinico	Krause et al., 1998
Immunizzazione attiva senza antigene	?Cellule dendritiche	MAGE	DNA	Pre-clinico	Ross et al, 1997

(da Luzzatto, 1998b)