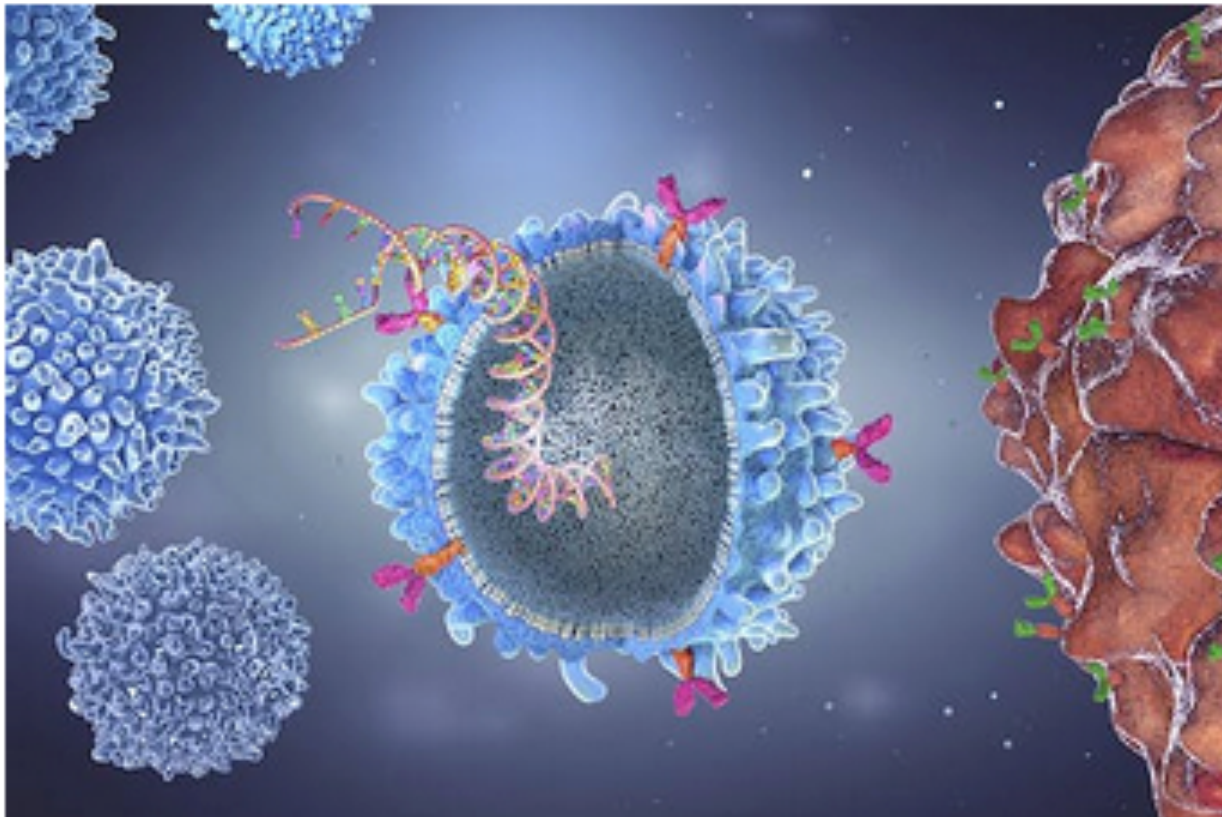


Che cosa sono le terapie cellulari?

Le terapie cellulari rientrano tra le cosiddette terapie avanzate, in grado di offrire nuove e innovative opportunità di trattamento. Nello specifico, utilizzano una preparazione di cellule o tessuti manipolati in laboratorio, in modo che le caratteristiche siano modificate.



**Cellule, i nuovi farmaci
viventi**



Le terapie avanzate

Le terapie avanzate (Advanced Therapy Medicinal Product, o ATMP) di cui fanno parte le CAR-T, sono farmaci veri e propri ma non di sintesi chimica bensì basati su geni, cellule e tessuti, geneticamente modificati in laboratorio e poi somministrati al paziente.

Esse comprendono 4 diverse tipologie di prodotti medicinali:

- medicinali di terapia genica
- medicinali di terapia cellulare
- medicinali di ingegneria tissutale
- medicinali di terapia avanzata combinata

I medicinali di terapia genica curano una malattia agendo direttamente sulla componente genetica che l'ha causata. La terapia genica sfrutta la tecnica del DNA ricombinante e funziona andando a supplementare, tramite un virus inattivato e innocuo (vettore virale), un tratto di DNA (gene ricombinante terapeutico) creato in laboratorio nelle cellule dell'organismo per correggere il difetto genetico. Ad oggi, la terapia genica risulta utile soprattutto per la cura di malattie genetiche ereditarie per le quali il gene difettoso è noto (per esempio, la fibrosi cistica), ma in futuro potrebbe essere utilizzata anche per curare tumori, malattie cardiovascolari e neurodegenerative.

I medicinali di terapie cellulari si basano sull'utilizzo di cellule o tessuti che sono stati manipolati per cambiare le loro caratteristiche biologiche, o su cellule e tessuti non destinati ad essere utilizzati per le stesse funzioni originali. La terapia cellulare viene utilizzata per curare ma anche per diagnosticare e prevenire le malattie. Attualmente, la terapia cellulare più utilizzata è il trapianto di cellule staminali del sangue per trattare tumori ematologici come linfomi, leucemie, mielomi, o malattie del sistema immunitario. Inoltre, è ormai comune anche l'utilizzo delle staminali della pelle per trapianti in pazienti con gravi ustioni.

I medicinali di ingegneria tissutale sono costituiti da cellule e tessuti modificati in modo da poter essere impiegati per riparare, rigenerare o sostituire tessuti umani. Si tratta di farmaci estremamente innovativi che negli ultimi anni hanno portato numerosi benefici in diversi ambiti clinici come la reumatologia, l'oncologia, le malattie rare, l'onco-ematologia e l'infettivologia.

I medicinali di terapia avanzata combinati contengono all'interno uno o più dispositivi medici parte integrante del farmaco. Un esempio sono le cellule fatte crescere su matrici biodegradabili o supporti sintetici.

Le CAR-T possono essere considerate in parte terapie cellulari, in quanto utilizzano cellule immunitarie come i linfociti T, in parte terapie geniche, in quanto i linfociti T vengono "ingegnerizzati", ossia modificati geneticamente.



Come funzionano

Il meccanismo d'azione delle CAR-T si basa su un concetto semplice e rivoluzionario al tempo stesso: combattere i tumori come se fossero un agente estraneo al corpo, una sorta di infezione, "armando" il sistema immunitario del paziente in modo da risvegliare la risposta immunitaria e attivarla per riconoscere le cellule maligne e ucciderle.

I linfociti T e la sorveglianza immunologica

I **linfociti T** sono un particolare tipo di globuli bianchi responsabili della difesa del nostro organismo dalle malattie, e sono in grado di riconoscere e sopprimere le cellule tumorali svolgendo un'azione di "sorveglianza immunologica". Tuttavia, nei pazienti onco-ematologici i linfociti T non sono in grado di garantire una difesa immunitaria ottimale.

L'"evasione" delle cellule tumorali

Parallelamente, le cellule tumorali sviluppano strategie che permettono loro di non essere riconosciute dal sistema di sorveglianza. In generale, lo fanno camuffandosi, apparendo cioè come cellule "sane", nascondendo i recettori di superficie tipici del tumore. Ma sono anche in grado di esprimere in superficie tanti recettori che impediscono l'azione dei linfociti T, o ancora creando un contesto di aumentata infiammazione che favorisce lo sviluppo del tumore e confonde la risposta immunitaria.

L'attivazione del recettore CAR

Le CAR-T possono contrastare questa evasione, permettendo al sistema immunitario di individuare il tumore. I linfociti T prelevati dal paziente vengono manipolati in laboratorio in modo da esprimere uno specifico recettore (CAR) per l'antigene di membrana (per esempio, CD19) espresso sulla superficie della cellula maligna. In questo modo, il linfocita T è in grado di riconoscere e aggredire le cellule tumorali esprimenti questo antigene, provocandone la morte.

Quali tipologie di oncoterapie cellulari esistono?

Le CAR-T

Con il termine **CAR-T**, *Chimeric Antigen Receptor* (cellule T con recettore chimerico dell'antigene), si definisce un tipo di **trattamento in cui i linfociti T prelevati da un paziente vengono reinfusi nel suo organismo dopo essere stati modificati geneticamente in laboratorio per potenziarne l'azione contro il tumore**. I linfociti T sono cellule fondamentali del sistema immunitario, una delle armi più potenti che il nostro organismo ha a disposizione per contrastare lo sviluppo di numerose malattie infettive e non solo. Nella tecnica per produrre CAR-T, nel DNA dei linfociti T viene inserito, tramite un vettore virale reso inattivo, un gene che fa esprimere un recettore detto CAR. Questa proteina trasforma i linfociti T in una sorta di killer delle cellule tumorali che in superficie portano un bersaglio specifico, riconosciuto appunto dal CAR. Il CAR, recettore chimerico per l'antigene, deve il suo nome al fatto di essere costituito da porzioni di molecole diverse assemblate in laboratorio, così come la mitologica chimera è composta da parti di diversi animali.

Si tratta di un **trattamento personalizzato, sviluppato individualmente per ogni paziente, che viene somministrato una tantum**. La terapia CAR-T rappresenta una delle forme più avanzate di immunoterapia antitumorale.

CAR-NK

Le cellule *Natural Killer*, NK in sigla, sono linfociti molto attivi nel **riconoscere e attaccare tumori e patogeni**. Sono cellule "nate per uccidere", ed è stato accertato che se le loro funzioni sono compromesse aumenta il rischio di diversi tipi di cancro. Nella terapia a base di cellule NK, queste cellule non vengono prelevate dallo stesso paziente ma da un donatore sano (in alcune sperimentazioni sono ottenute dal sangue del cordone ombelicale) e sempre con la tecnica utilizzata per le CAR-T vengono prima ingegnerizzate e poi infuse nel paziente.

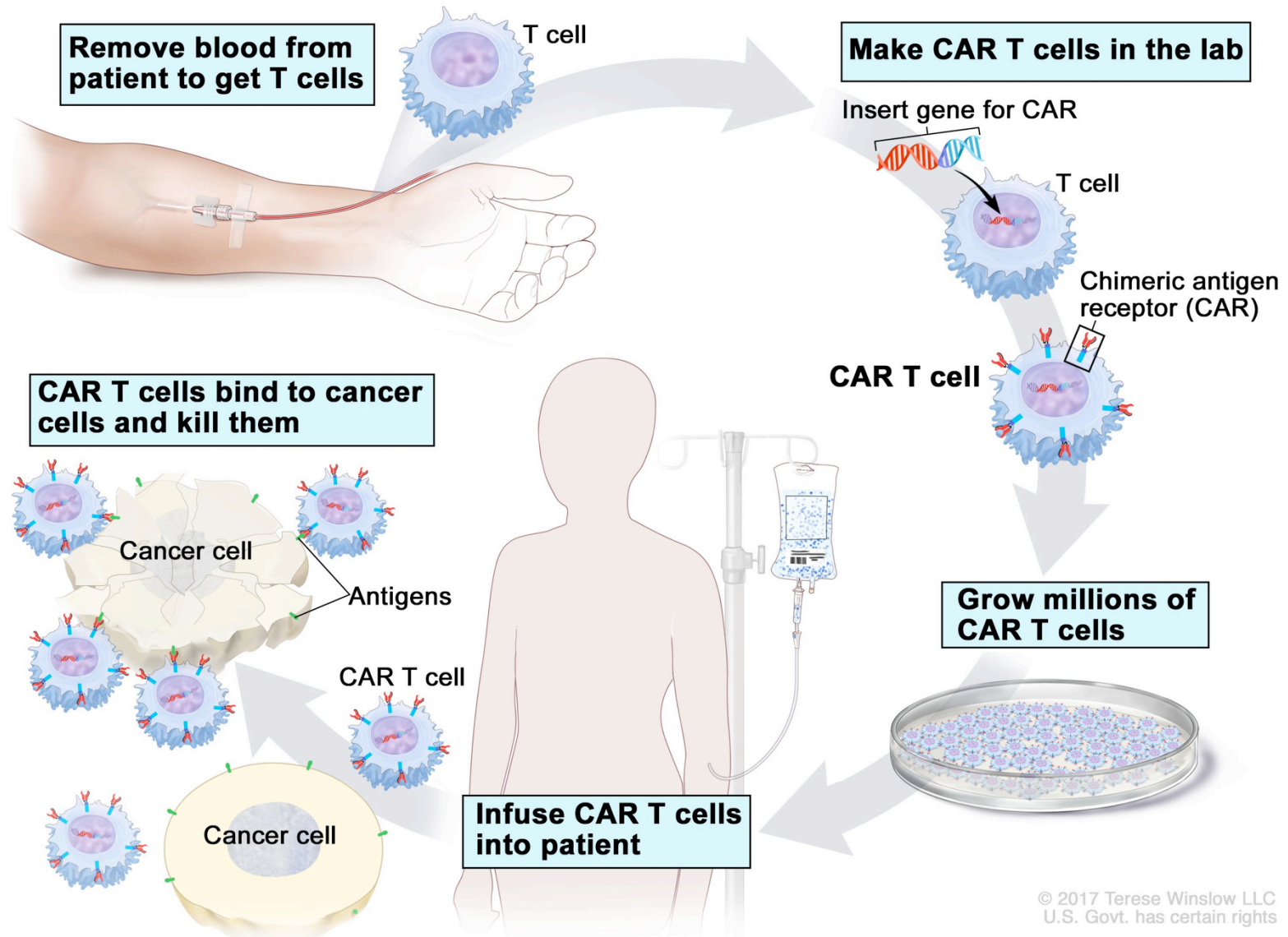
L'uso di cellule CAR-NK è oggetto di diversi studi sperimentali per il **trattamento sia dei tumori ematologici sia di quelli solidi**, come per esempio il cancro all'ovaio e il glioblastoma.

TIL

Le cellule TIL sono i **linfociti infiltranti i tumori**, ovvero linfociti del paziente che già "riconoscono" la malattia, ma non sono capaci di sconfiggerla. Uno scenario promettente che sfrutta i TIL arriva da uno studio sperimentale del National Cancer Institute di Bethesda, condotto su una donna con tumore al seno metastatico che non rispondeva ad altri trattamenti. I risultati sono stati pubblicati su *Nature Medicine* a giugno 2018. I ricercatori hanno messo a punto **una forma modificata di terapia cellulare altamente personalizzata che ha permesso di identificare e selezionare i TIL più capaci nel riconoscere il tumore della paziente**. Li hanno poi cresciuti in coltura e reinfusi nella donna a cui è stato anche somministrato pembrolizumab, un inibitore di checkpoint. **A distanza di 22 mesi dal trattamento il carcinoma metastatico era scomparso**, si è ottenuta cioè la completa remissione. **Si tratta di un primo risultato, certamente importante, ma che deve essere confermato da altre ricerche che utilizzino la stessa procedura**.

Overview of CAR T-cell therapy in the clinic.

CAR T-cell Therapy



Contro quali tipi di tumore sono dirette?

Le terapie cellulari che utilizzano linfociti ingegnerizzati sono state inizialmente sviluppate per la cura dei tumori ematologici, dando risultati nel trattamento di **leucemie e linfomi di tipo B**, mentre **proseguono le sperimentazioni per altri tumori del sangue** come la leucemia linfatica cronica e il mieloma multiplo. Molte ricerche sono ancora in corso per studiarne l'efficacia anche nei tumori solidi come per esempio quelli dell'ovaio, del seno, del polmone, del pancreas, il neuroblastoma e il glioblastoma.

Quali sono le terapie cellulari approvate in Italia?

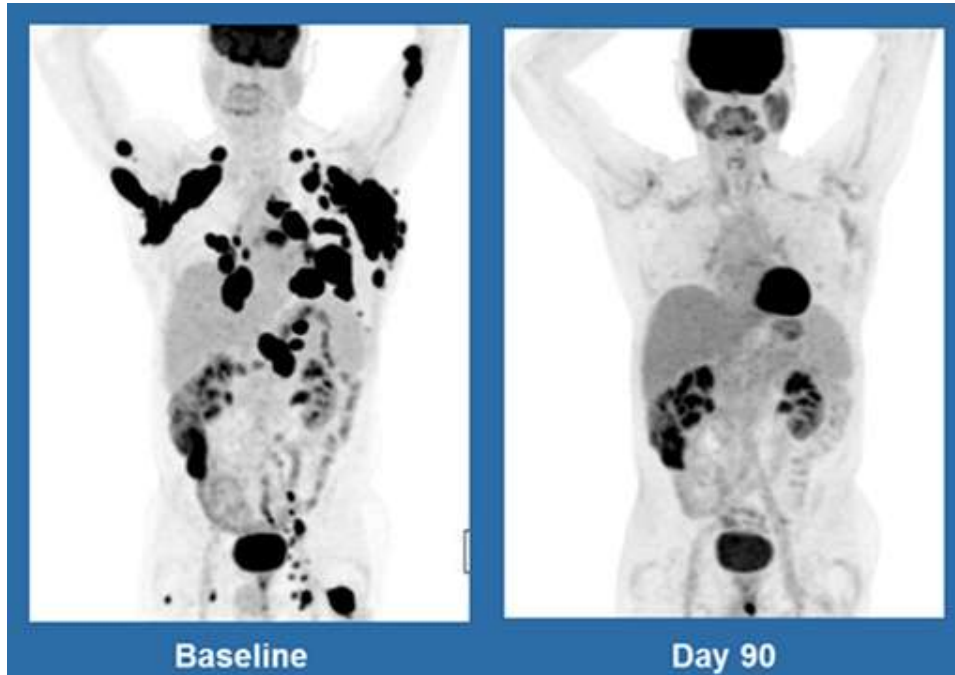
La prima terapia cellulare approvata in Italia dall'AIFA nell'agosto 2019 è quella con CAR-T denominata tisagenlecleucel, indicata per pazienti fino a 25 anni di età con leucemia linfoblastica acuta (LLA) a cellule B e per pazienti adulti con linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL), resistenti alle altre terapie o nei quali la malattia sia ricomparsa dopo una risposta ai trattamenti standard. Può essere prescritta e utilizzata presso i Centri specialistici selezionati dalle Regioni.

Le sperimentazioni in corso

In Italia, grazie anche al sostegno di AIRC, l'uso di terapie CAR-T nella leucemia linfoblastica del bambino ha già dato risultati in fase sperimentale all'Ospedale Bambino Gesù di Roma, con il gruppo guidato da Franco Locatelli, e all'Ospedale San Gerardo di Monza, con a capo della ricerca Andrea Biondi, dove nel 2016, nell'ambito dello studio per la registrazione del tisagenlecleucel, è stata trattata in via sperimentale la prima bambina italiana.

Lo stesso Locatelli ha condotto uno studio, sostenuto da AIRC, Ministero della salute e Regione Lazio, in cui l'editing genetico prevede anche l'inserimento della Caspasi 9 (in sigla iC9), una sorta di gene "suicida" in grado di bloccare i linfociti T modificati, attivabile qualora si presentassero degli effetti collaterali a causa dei trattamenti con CAR-T. Il primo paziente trattato all'inizio del 2018 è stato un bambino di 4 anni affetto da leucemia linfoblastica acuta di tipo B cellulare che aveva già avuto due ricadute della malattia; nel giro di poco tempo dall'infusione la malattia del bambino è andata in remissione, ovvero non c'erano più tracce di cellule leucemiche nel suo midollo osseo. Il team di Locatelli sta lavorando per utilizzare questa tecnica anche contro il neuroblastoma, il tumore solido più frequente in età pediatrica; altre possibili applicazioni potrebbero essere le terapie contro il mieloma multiplo e il linfoma non Hodgkin a cellule B.

Il progetto INCAR (*Innovative CAR Therapy Platform*), guidato da Andrea Biondi dell'Università degli Studi di Milano Bicocca e Ospedale San Gerardo di Monza, si pone invece l'obiettivo di rendere i trattamenti con CAR-T più accessibili ed economici, elaborando metodi di produzione che permettano di sviluppare ulteriormente questa terapia per poterla applicare anche ad altri tipi di tumori. INCAR è sostenuto da Accelerator Award, il programma internazionale nato nel 2018 da tre organizzazioni non profit: la britannica Cancer Research UK (CRUK), la spagnola Fundación Científica - Asociación Española Contra el Cáncer (FC AECC) e l'italiana Fondazione AIRC.



These scans show a 62-year-old man with **non-Hodgkin lymphoma**, at left in **December 2015**, and **three months after treatment with Kite Pharma's experimental gene therapy at MD Anderson Cancer Center in Houston**. The treatment, called CAR-T cell therapy, turns a patient's own blood cells into specialized cancer killers. It worked in a study, with more than one third of very sick lymphoma patients showing no sign of disease six months after a single treatment, its maker said Tuesday, Feb. 28, 2017. The scans are from a presentation by Drs. Fred Locke and Sattva Neelapu, provided by the American Society for Blood and Marrow Transplantation and Kite. (ASBMT/ Kite Pharma via AP)

<https://medicalxpress.com/news/2017-02-gene-therapy-blood-cancer-major.html#jCp>



What are biopharmaceuticals?

Complex medicines produced
by living cells or organisms

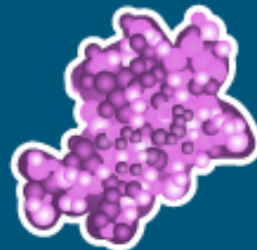
How complex are they?

Small molecule drug
(e.g. aspirin)



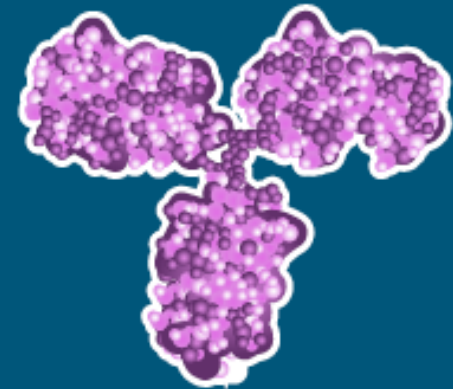
0.18 kD
(21 Atoms)

Small biologic
(e.g. somatropin)



~22 kD
(~3,000 Atoms)

Large biologic
(e.g. monoclonal antibody)



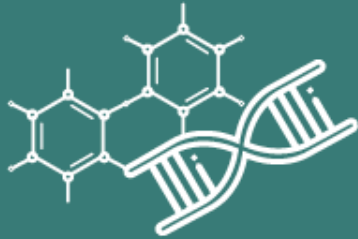
~150 kD
(>20,000 Atoms)



Complexity

Two classes of biopharmaceuticals

Innovator biologics



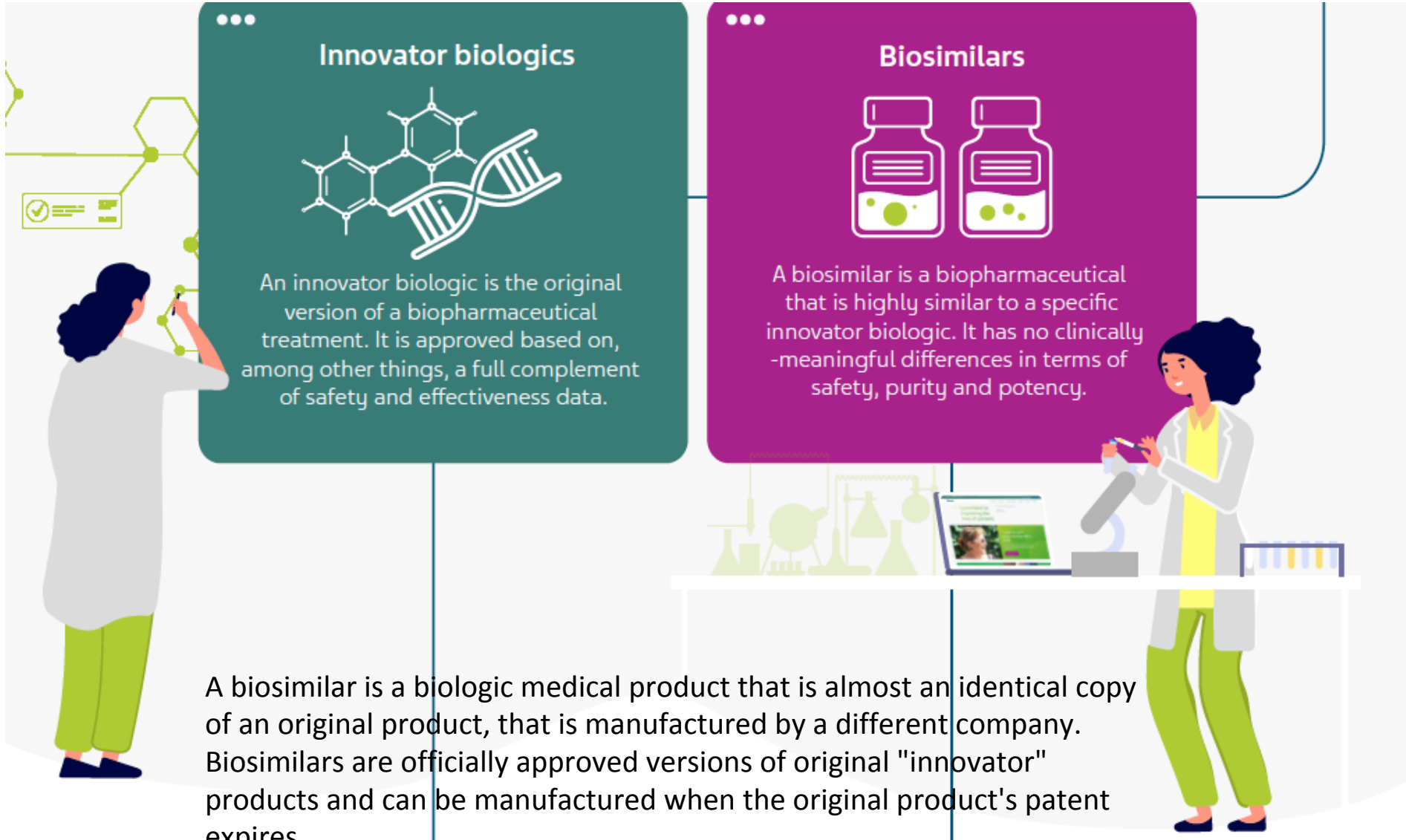
An innovator biologic is the original version of a biopharmaceutical treatment. It is approved based on, among other things, a full complement of safety and effectiveness data.

Biosimilars

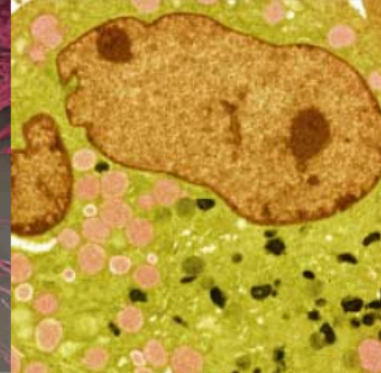
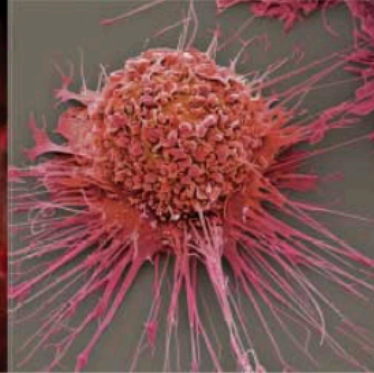
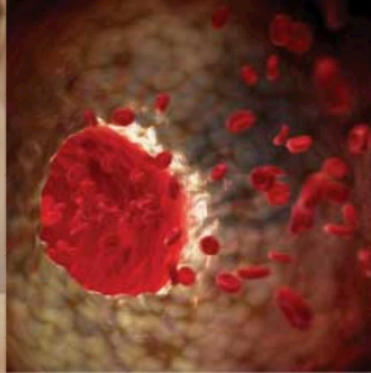
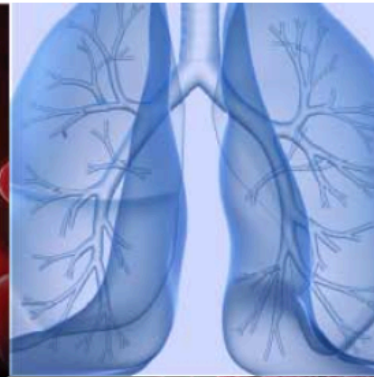
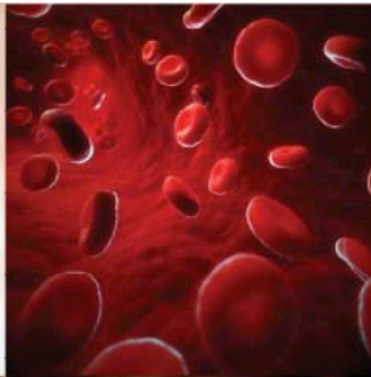


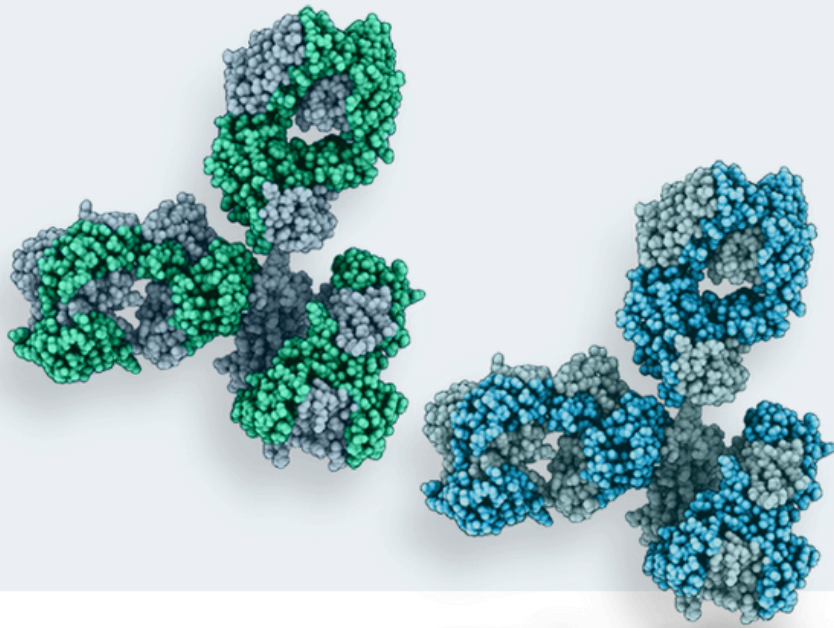
A biosimilar is a biopharmaceutical that is highly similar to a specific innovator biologic. It has no clinically-meaningful differences in terms of safety, purity and potency.

A biosimilar is a biologic medical product that is almost an identical copy of an original product, that is manufactured by a different company. Biosimilars are officially approved versions of original "innovator" products and can be manufactured when the original product's patent expires.



BIOLOGICS HAVE BEEN USED SUCCESSFULLY TO TREAT MANY DIFFERENT LIFE-THREATENING AND CHRONIC DISEASES





What is a biosimilar?

A biosimilar product is a biologic product that is approved based on demonstrating that it is highly similar to an FDA-approved biologic product, known as a reference product, and has no clinically meaningful differences in terms of safety and effectiveness from the reference product. Only minor differences in clinically inactive components are allowable in biosimilar products.

How are biosimilars different from generic medicines?

While identical generic versions of small molecules can be chemically synthesized, it is not possible to create identical versions of reference biologic medicines, due to their complexity. Therefore, the processes used to develop generic medicines cannot be applied to the development of biosimilar medicines.

THE COMPLEXITY OF BIOLOGICS

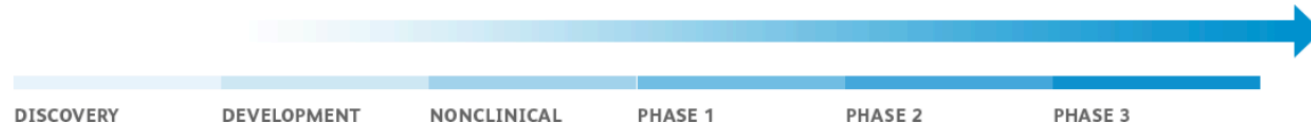
Biosimilars (and reference biologics) are created in living cells and require significant expertise and state-of-the-art technology in development and manufacturing.

DRUG DEVELOPMENT COMPARISON

New Medicine (including cost of failures)

Development time: >10 years

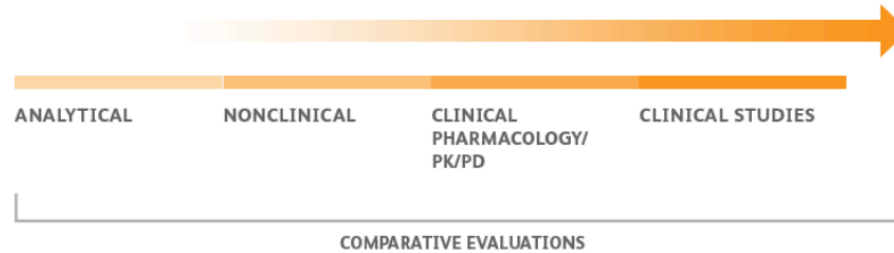
Cost: ~\$2.6 billion



Biosimilar (cost of failures not available)

Development time: ~5 to 9 years

Cost: >100 million*



*Not including regulatory fees.

Small-Molecule Generic

Development time: ~2 years

Cost: ~\$1 to 2 million



The development processes for biologics and biosimilars are considerably more rigorous than the development process for small-molecule generics.

Extrapolation of clinical data for multiple biosimilar indications

Extrapolation is a scientific and regulatory principle that refers to the approval of a biosimilar for use in an indication held by the reference product but not directly studied in a comparative clinical trial with a biosimilar. Extrapolation of efficacy and safety data from one indication to another may be considered if biosimilarity to the reference product has been shown by a comprehensive comparability program, including safety, efficacy, and immunogenicity in a key indication that is suitable to detect potentially clinically relevant differences, and there is sufficient scientific justification for extrapolation. Extrapolation of data is an established scientific and regulatory principle that has been exercised for many years.



Why extrapolation?

Extrapolation is essential to biosimilar development. In addition to helping streamline the approval process, extrapolation makes it possible to avoid studies unnecessary for regulatory approval and to allocate resources to areas where studies may be more valuable. Extrapolation may also reduce development costs, thereby making valuable medicines potentially more accessible to patients.

Establishing and confirming biosimilarity, together with product-specific scientific justification, are central to the extrapolation of indications for biosimilars

The totality of evidence demonstrating biosimilarity and scientific justification are crucial to the regulatory approval for extrapolation. While clinical studies play a supporting role, analytical studies are an essential tool for establishing biosimilarity and are typically more sensitive than traditional clinical endpoints in this respect. Over the past 20 years, there has been a 10 million-fold increase in the sensitivity of some analytics. Because of this, many relevant structural components and functions of even a monoclonal antibody can now be determined with high sensitivity, and the structure-function relationships determined. In addition to the data from the totality of evidence, experience with the reference biologic is used to support extrapolation.



Extrapolation requires scientific justification

Aspects that may be considered for scientifically justifying extrapolation may include mechanism of action (MOA) in each indication, PK and biodistribution, expected toxicities, and any other factor (such as comorbidities). Thus, extrapolation is not automatic and is considered only after biosimilarity is established based on the totality of evidence.

KEY ASPECTS THAT MAY BE CONSIDERED FOR EXTRAPOLATION

✓ MOA IN EACH CONDITION

- Binding and molecular signaling
- Location and expression of target/receptor

MOA=mechanism of action

✓ PK AND BIODISTRIBUTION

- PD measures may also provide important MOA information

PK=pharmacokinetics
PD=pharmacodynamics



✓ EXPECTED TOXICITIES

- Differences may exist in each condition of use and patient population

✓ ANY OTHER FACTOR

- Other factors may include comorbidities or concomitant medications

Interchangeability

Interchangeability is defined by statute in the United States to mean that the product may be substituted for the reference product without the intervention of the physician who prescribed the reference product. The legal standard for interchangeability is an additional standard beyond demonstration of biosimilarity.

According to guidance issued by the FDA in May 2019, in order for a biological product to be deemed interchangeable, the information submitted must be sufficient to show that:

- ✓ The biological product is biosimilar to the reference product and can be expected to produce the same result as the reference product in any given patient
- ✓ For a biologic product that is administered more than once to an individual, the risk in terms of safety or diminished efficacy of alternating or switching between use of the biological product and the reference product is not greater than the risk of using the reference product without such alternation or switch



A cosa possono servire le proteine ricombinanti?

-PROTEINE DI INTERESSE TERAPEUTICO.

-PROTEINE DI INTERESSE COMMERCIALE (ENZIMI).

-PROTEINE DA UTILIZZARE COME ANTIGENI PER LA PRODUZIONE DI ANTICORPI POLICLONALI E MONOCLONALI.

-REAGENTI PER LA RICERCA BI BASE E APPLICATA.

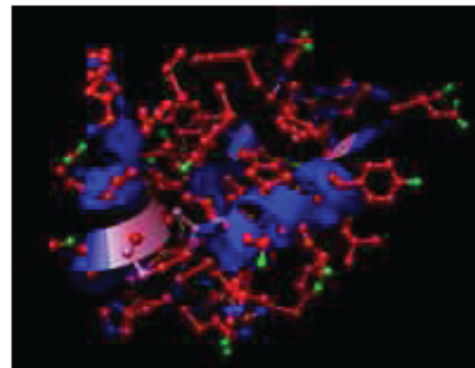
Produzione di proteine

Brand	Generic	Company	Therapeutic category	Indications
Humulin	Insulin	Eli Lilly	Diabetes	Diabetes
Humatrope	Recombinant Somatropin	Eli Lilly	Hormones	Growth failure
Genotropin	Somatropin	Pfizer	Hormones	Growth failure
Saizen	Somatropin	Serono	Hormones	Growth failure
Nutropin/Protropin	Somatropin/Somatrem	Genentech	Hormones	Growth failure
Intron A &	Interferon alpha-2b/	Schering-Plough	Anti-infective	Viral infections
Avonex	Interferon beta-1a	Biogen Idec	Multiple sclerosis	Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy
Betaseron/Betaferon	Interferon beta-1b	Schering AG	Multiple sclerosis	Multiple sclerosis
Procrit/Eporex	Epoetin alpha	J&J	Blood modifier	Anaemia
Epogen	Epoetin alpha	Amgen	Blood modifier	Anaemia
NeoRecormon	Epoetin beta	Roche	Blood modifier	Anaemia
Kogenate	Factor VIII	Bayer	Blood modifier	Haemophilia
NovoSeven	Factor VIIa	Novo Nordisk	Blood modifier	Haemophilia
Benefix	Factor IX	Wyeth	Blood modifier	Haemophilia
Fabrazyme	Agalsidase beta	Genzyme	Enzymes	Fabry disease
Replagal	Agalsidase alfa	TKT Europe	Enzymes	Fabry disease
Pulmozyme	Dornase alpha	Genentech	Enzymes	Cystic fibrosis
Activase/Actilyse	Alteplase	Genentech	Blood factor	Myocardial infarction

Farmaci biotecnologici

- Il primo farmaco ottenuto ingegnerizzando un sistema vivente (batterico) è stato l'insulina, approvato dalla FDA nel 1982.
- Anche l'ormone della crescita umano, precedentemente estratto dai cadaveri, fu rapidamente ingegnerizzato.
- Nel 1986 la FDA approvò il primo vaccino umano, contro l'epatite B.

La produzione industriale di farmaci utilizzando i sistemi viventi come bioreattori si è da allora largamente diffusa, diventando attualmente la via preferita di sintesi di numerosi farmaci



La struttura dell'Insulina
rosso:carbonio, verde:ossigeno;
blu:azoto; rosa:zolfo

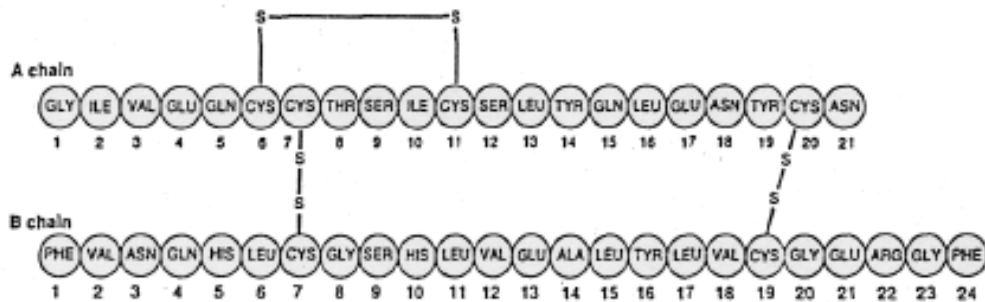
Più di 250 in commercio, più di 400 in trial clinico

“Ingegnerizzare “ il farmaco modificando la sequenza

Analoghi dell'insulina

Sono prodotti in cui la sequenza aminoacidica propria dell'insulina umana viene modificata ad arte con delle sostituzioni di uno o più aminoacidi.

Insulina Lispro



L'insulina lispro viene assorbita più rapidamente dall'organismo, quindi agire più rapidamente rispetto all'insulina naturale.

I prodotti a base di insulina lispro sono disponibili in varie forme: nella forma solubile Humalog, ad azione rapida (più o meno subito dopo l'iniezione), e nella forma Humalog NPL, una sospensione con protamina che viene assorbita più lentamente nel corso della giornata.



Azione rapida (< 30 minuti)

Durata breve (3 ore)



Farmaci biotecnologici

Altre categorie di farmaci prodotti mediante la tecnologia del DNA ricombinante

Ormoni Polipeptidici

Peptidi o piccole proteine che svolgono funzioni essenziali nel controllo del metabolismo nei mammiferi.

Alcuni sono farmaci salvavita



Ormone della crescita:
Humatrope®

Eritropoietina: regola la produzione di globuli rossi da parte del midollo osseo EPOCIM®

Farmaci biotecnologici

Altre categorie di farmaci prodotti mediante la tecnologia del DNA ricombinante

Proteine del sangue

roteine o fattori coinvolti nei processi della coagulazione del sangue (fattori VII, VIII, IX) sia nei processi che degradano i coaguli (TPA)

Si sono eliminati i rischi associati alla potenziale ontaminazione da parte di agenti virali (HIV, HBV, HCV)



TPA: Activase®



Fattore VIII: Recombinate®

Farmaci biotecnologici

Altre categorie di farmaci prodotti mediante la tecnologia del DNA ricombinante

Immunomodulatori e Antitumorali

I più noti sono gli interferoni che a seconda del tipo possono esplicare attività antivirale (α e β), immunomodulatrice (γ) o antitumorale (α).



Interferone β : usato nel trattamento della SM, agisce sui linfociti T inibendone la migrazione e riduce la produzione di citochine. **Avonex[®]**, **Betaferon[®]**, **Rebif[®]**



Interferone α : usato nel trattamento di cancro al rene, melanoma, alcune forme di linfoma e leucemie. **IntronA[®]**, **Infergen[®]**, **Alfaferone[®]**, **Roferon-A[®]**



Interferone γ : usato per ridurre l'incidenza di infezioni in pazienti con ridotte difese immunitarie. **Imukin[®]**



Produzione di proteine

Monoclonal Antibodies

Brand	Generic	Company	Therapeutic category	Indications
ReoPro	Abciximab	Eli Lilly	Blood modifier	Acute coronary syndrome
Rituxan	rituxumab	Genentech	Cancer	Non-Hodgkin's lymphoma
Herceptin	Trastuzumab	Genentech	Cancer	Breast cancer
Synagis	Palivizumab	MedImmune	Respiratory	Respiratory syncytial virus
Campath	Alemtuzumab	Schering AG	Cancer	Non-Hodgkin's lymphoma
Humira	Adalimumab	Abbott Labs	Anti-arthritic	Rheumatoid arthritis
Xolair Omalizumab	Omalizumab	Genentech	Respiratory diseases	Paediatric asthma, peanut allergies
Erbix	Cetuximab	Imclone Systems	Cancer	Colon cancer
Avastin	Bevacizumab	Genentech	Cancer	Colon cancer

Vaccino contro l'Epatite B: 1° Vaccino Ricombinante Autorizzato

- Il gene virale che codifica per *HBsAg* è stato clonato in un vettore e quindi trasferito ed espresso in un lievito *S. Cerevisiae*
- L'antigene prodotto dal lievito presenta tutte le caratteristiche della proteina *HBsAg* nativa (glicosilazione e altre modifiche post-traduzionali)
- Antigene viene purificato per ultracentrifugazione, cromatografia e precipitazioni frazionate (purezza > 98%) viene adsorbito su $Al(OH)_3$ che funziona da adiuvante



Engerix-B®



Vettori di espressione per la produzione di proteine

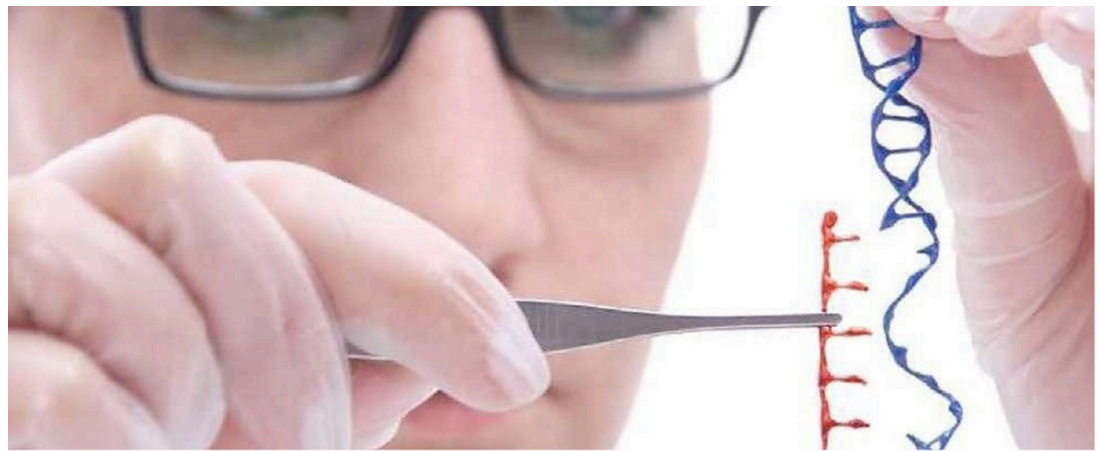
QUALI SISTEMI ETEROLOGHI UTILIZZARE PER L'ESPRESSIONE DEI GENI ?

E' virtualmente possibile esprimere geni in sistemi di ogni tipo utilizzando vettori d'espressione appropriati, in funzione di esigenze specifiche.

I più diffusi:

- *Escherichia coli*,
- *Bacillus subtilis*,
- *Lieviti (yeast)*
- *cellule d'insetto/sistemi virali (Insect cells)*
- *cellule vegetali*
- *cellule di mammifero in coltura (mammalian cells)*

L'espressione in E.coli è di gran lunga la più semplice e, forse, per questo la più utilizzata come prototipo di espressione genica in sistemi eterologhi.



07 aprile 2015

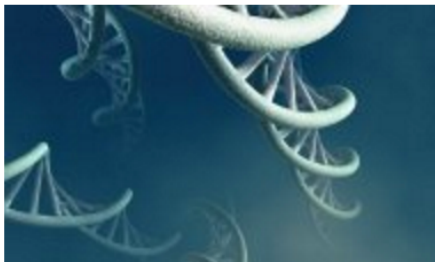
Nuove forbici molecolari per l'editing genetico



Specifici geni possono essere modificati *in vivo* grazie a una versione più piccola dell'enzima Cas9, una forbice molecolare già utilizzata per ingegnerizzare il genoma. In uno studio sui topi, i ricercatori sono riusciti a modificare l'attività del gene che controlla il colesterolo, diminuendone i livelli nel sangue

03 dicembre 2015

Interventi di editing genetico sempre più mirati e sicuri

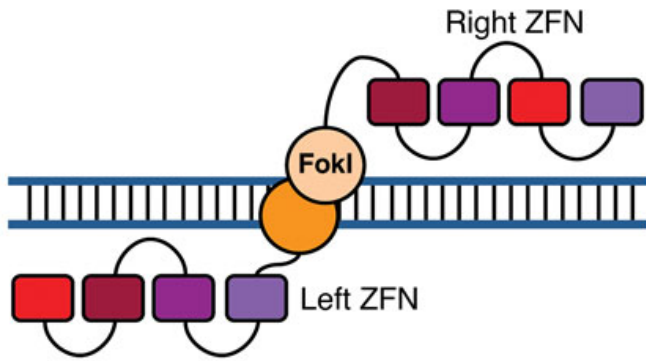


Cambiando solo tre amminoacidi dei 1400 circa che formano la proteina Cas9 - le "nanoforbici" usate nella nuova tecnica di modificazione del genoma chiamata CRISPR/Cas9 - è possibile assicurarsi che l'enzima non sbagli bersaglio e vada a colpire una parte indesiderata del DNA (*red*)

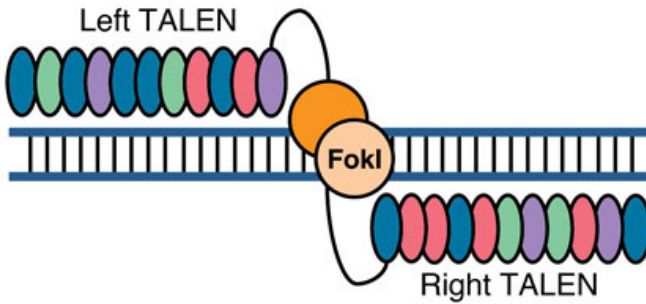
Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

Ci sono varie tecnologie per fare “gene editing”

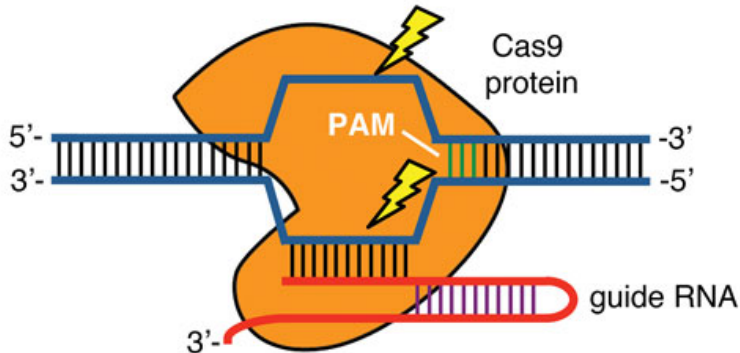
- Zinc finger
- TALEN
- Crispr-Cas9



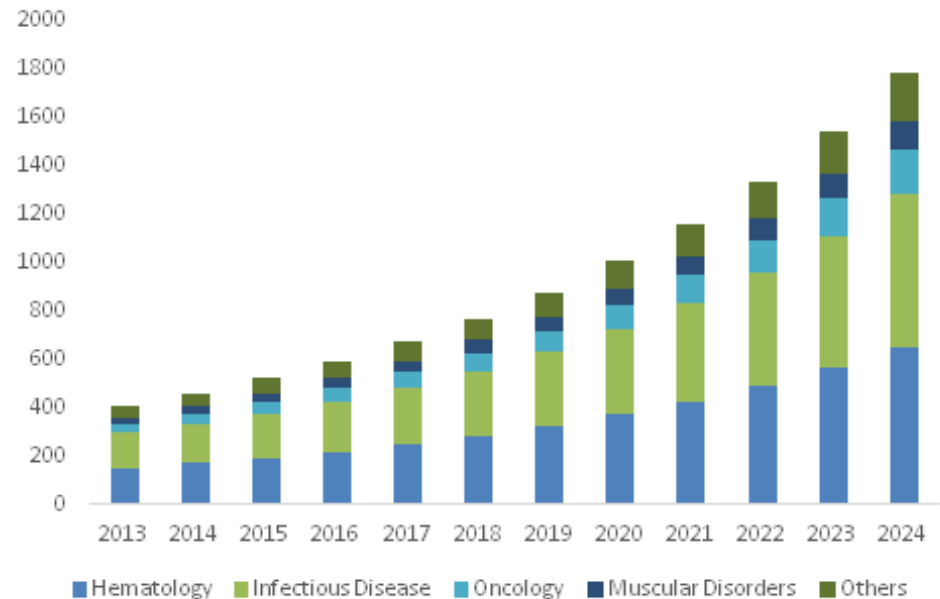
TALE nuclease



CRISPR/Cas9



Gene Editing Market Size



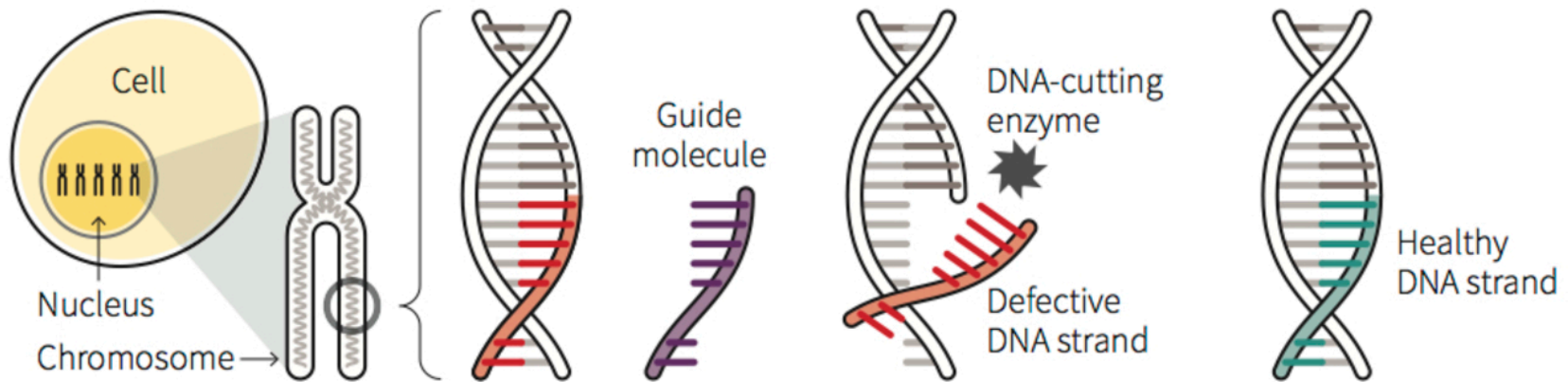
Genome editing tools have two features:

- 1) Recognize specific DNA sequences (i.e. specific genes or non-coding elements)
- 2) Cut DNA (“nuclease”), then a scar is left behind




DNA editing

A DNA editing technique, called CRISPR/Cas9, works like a biological version of a word-processing programme's "find and replace" function.

HOW THE TECHNIQUE WORKS



A cell is transfected with an enzyme complex containing:

-  Guide molecule
-  Healthy DNA copy
-  DNA-cutting enzyme

A specially designed synthetic guide molecule finds the target DNA strand.

An enzyme cuts off the target DNA strand.

The defective DNA strand is replaced with a healthy copy.

Sources: Reuters; Nature; Massachusetts Institute of Technology

CRISPR/CAS9: il primo sistema preciso di "gene editing"

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

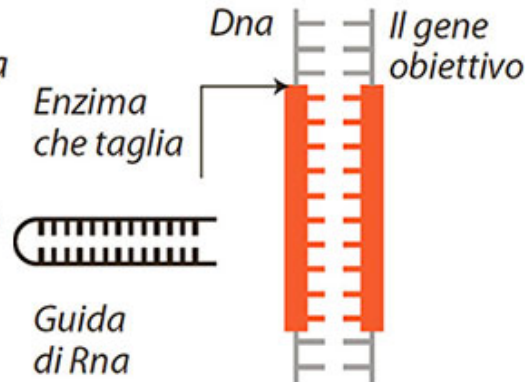
La tecnica



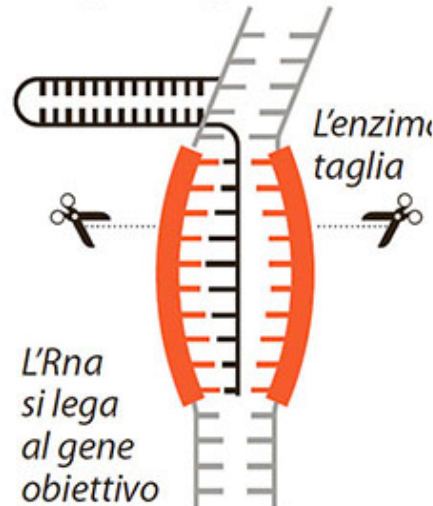
La "guida" fatta di Rna

1 Un enzima "taglia" il Dna nel punto voluto

Per guidarlo verso l'obiettivo viene creata in laboratorio una **molecola di Rna** che funge da guida



2 L'Rna si lega al gene da tagliare, poi l'enzima lo taglia **nel punto voluto**



3

Il gene tagliato viene sostituito con un gene sintetizzato in laboratorio



L'intervento può terminare con l'eliminazione del gene

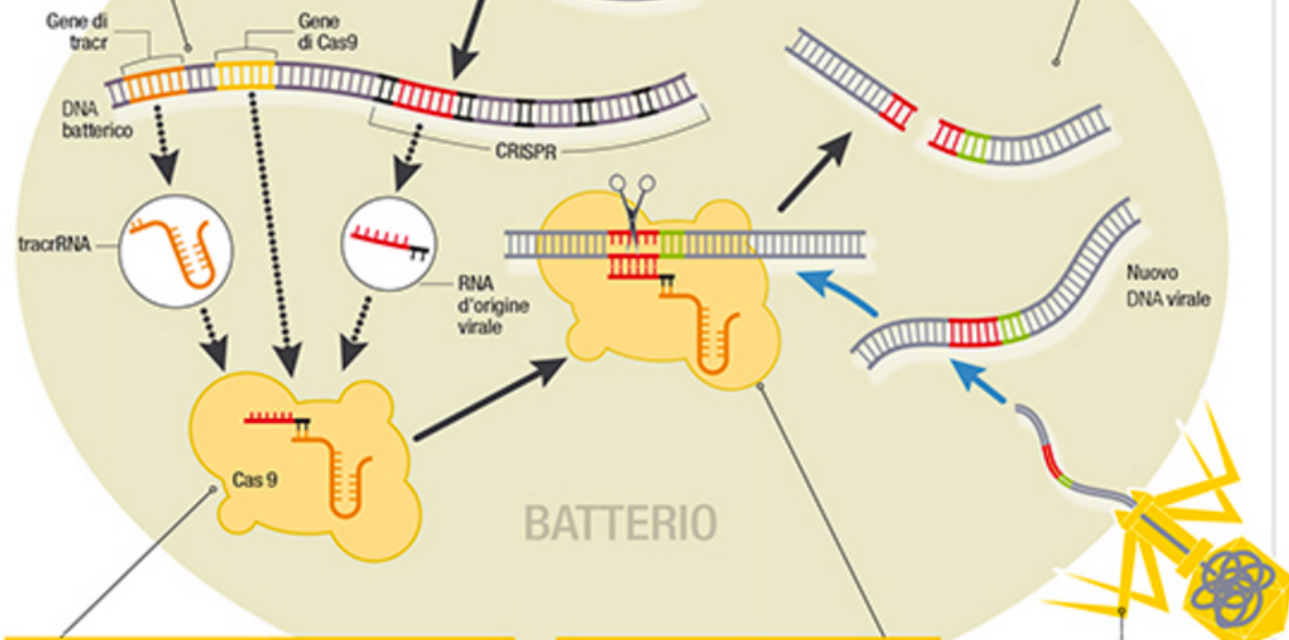
Oppure un nuovo gene può essere inserito al posto di quello tagliato

Come il sistema CRISPR-Cas9 protegge il batterio

Grazie al sistema CRISPR-Cas9, numerosi batteri riconoscono un virus che li ha già infettati e ne contrastano l'attacco. Simile a una biblioteca, CRISPR è una regione del genoma batterico dove, durante un attacco virale, il batterio accumula sequenze di DNA del virus stesso. Nel caso di un attacco successivo, l'enzima Cas9, guidato da due RNA, riconoscerà il nuovo DNA virale introdotto e lo disattiverà, tagliandolo.

2 Acquisizione

Riconosciute grazie a piccoli motivi adiacenti – le sequenze PAM – sequenze di DNA virale sono inserite nella regione CRISPR del genoma batterico.



1 Infezione

Un virus (batteriofago) inietta il suo DNA nel batterio.

6 Distruzione

Una volta distrutto, il DNA virale non può più servire a produrre le proteine necessarie alla replicazione del virus.

4 Maturazione di Cas9

Nel caso di un attacco virale, si attivano la regione CRISPR e una regione adiacente. Sono prodotti l'enzima Cas9 e un frammento di RNA, tracrRNA, oltre a un RNA per ciascuna sequenza virale registrata in CRISPR. Cas9 forma un complesso con tracr e con ciascun RNA virale.

5 Riconoscimento

L'enzima Cas9 riconosce la sequenza PAM sul DNA estraneo e poi, grazie ai suoi due RNA guida, una sequenza più lunga che lui stesso taglia a una distanza precisa da PAM (tre nucleotidi).

3 Nuova infezione

Un virus già incontrato inietta il suo DNA nel batterio.



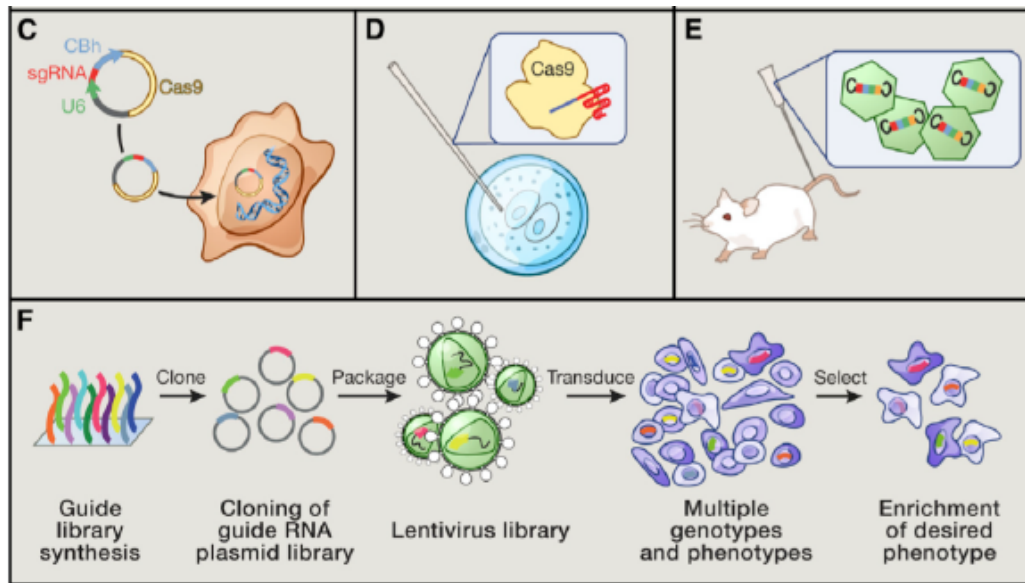
CRISPR/Cas9 system possible application

C) Cells can be transfected with plasmids coding for the Cas9 sequence, for the guideRNA and for the DNA template to perform gene correction

D) The purified Cas9 protein can be microinjected into fertilized zygotes to create animal models

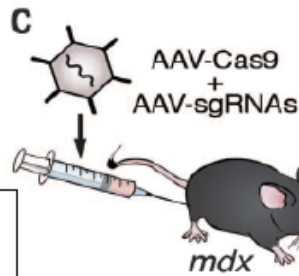
E) To detect a somatic effect, viral vectors encoding for CRISPR sequence can be injected inside animal models

F) Functional high-throughput screening can be performed by infecting cells with viral vectors encoding for library of gRNAs and select for the desired phenotype



Systemic delivery of CRISPR-Cas9 restores dystrophin expression in mouse

Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy

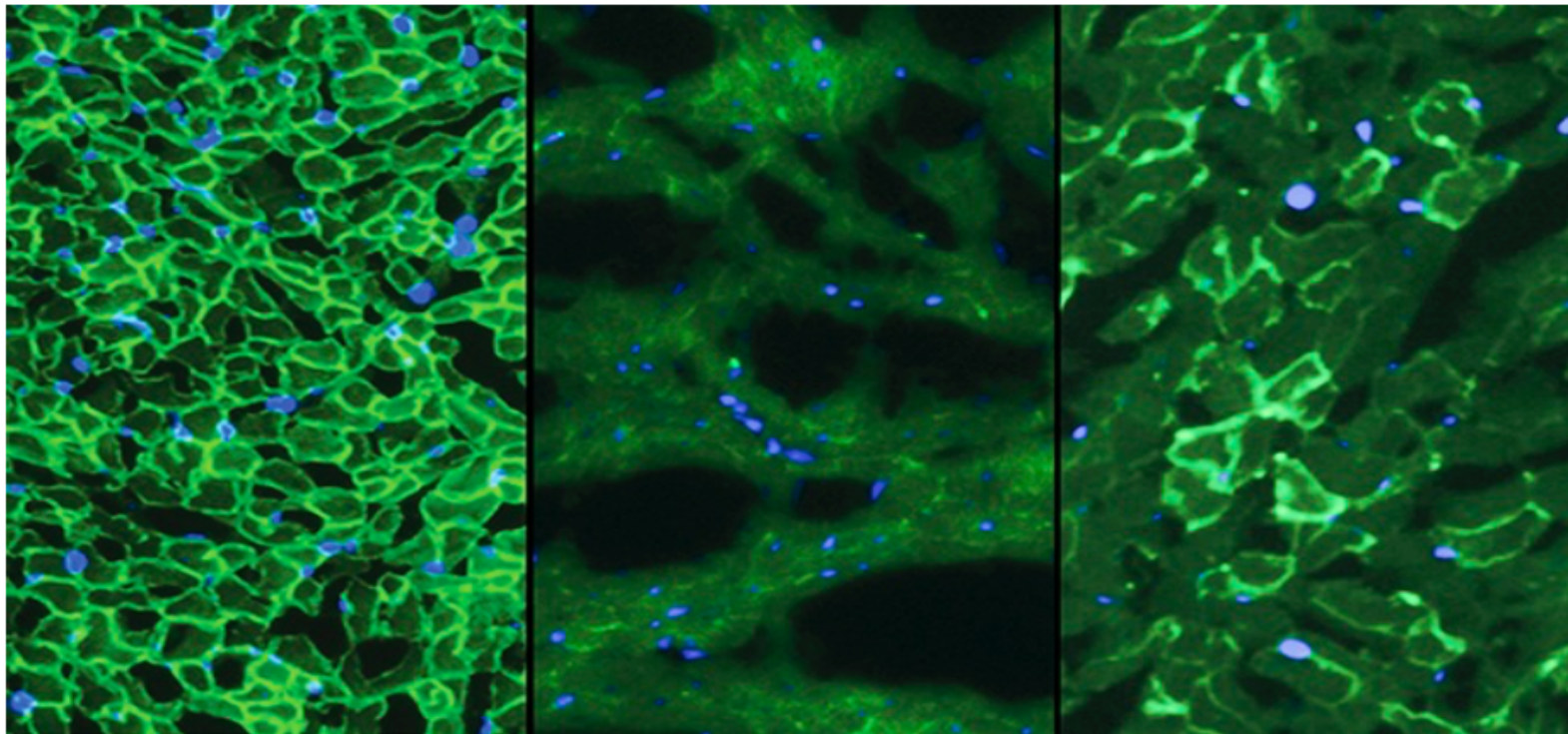


In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells

Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA

In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy

Science
AAAS



WT

Muscular Dystrophy

Muscular Dystrophy +
CRISPR/Cas 9

CRISPR/Cas9 system possible application

Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA

Chengzu Long,^{1*} John R. McAnally,^{1*} John M. Shelton,² Alex A. Mireault,¹ Rhonda Bassel-Duby,¹ Eric N. Olson^{1†}



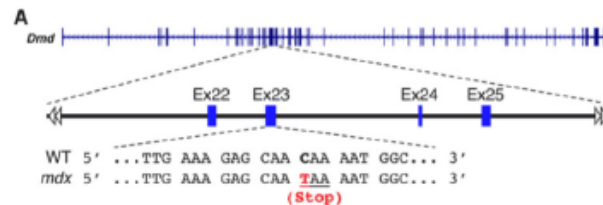
Duchenne Muscular Dystrophy (DMD)

It's a **X-linked pathology**, caused by a point mutation in the gene of Dystrophin (*Dmd*). This gene codifies for a large cytoskeletal structural protein, crucial for muscle cells and membrane integrity.



Animal model

mdx mice carrying a single point mutation (nonsense mutation) in the exon 23 of *Dmd* gene.



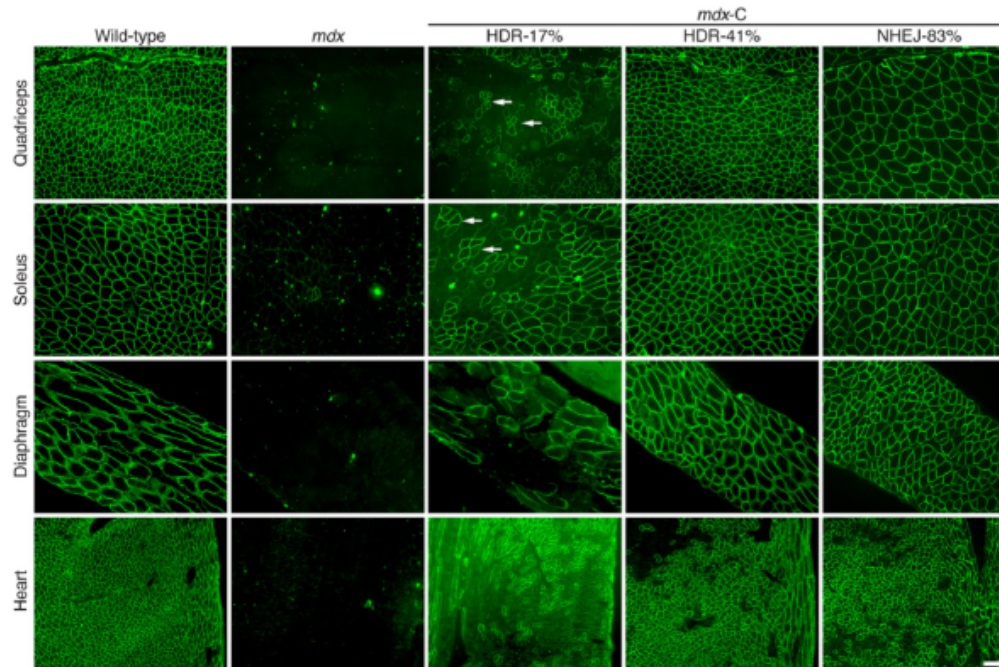
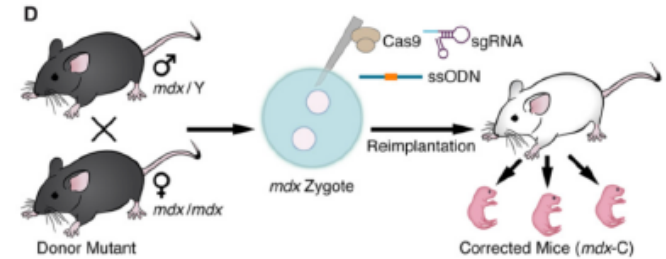
CRISPR/Cas9 system to correct the mutation

Cas9 mRNA, the sgRNA against *Dmd* exon 23 and ss oligonucleotide (ssODN) as donor DNA for gene correction were microinjected inside *mdx* Zygote. This was then reimplanted in pseudopregnant female mice.

CRISPR/Cas9 system possible application

Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA

Chengzu Long,^{1*} John R. McAnally,^{1*} John M. Shelton,² Alex A. Mireault,¹ Rhonda Bassel-Duby,¹ Eric N. Olson^{1†}

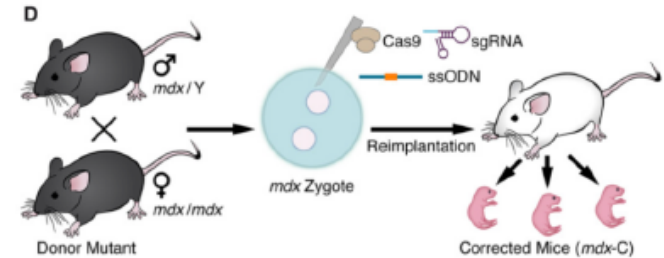


Dystrophin immunofluorescence (green) in wild-type mice is present in all muscles and is completely absent in *mdx* mice. In the HDR-41% and in the NHEJ-83% *mdx*-C mice muscles are composed by dystrophin-positive myofibers only.

CRISPR/Cas9 system possible application

Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA

Chengzu Long,^{1*} John R. McAnally,^{1*} John M. Shelton,² Alex A. Mireault,¹ Rhonda Bassel-Duby,¹ Eric N. Olson^{1†}



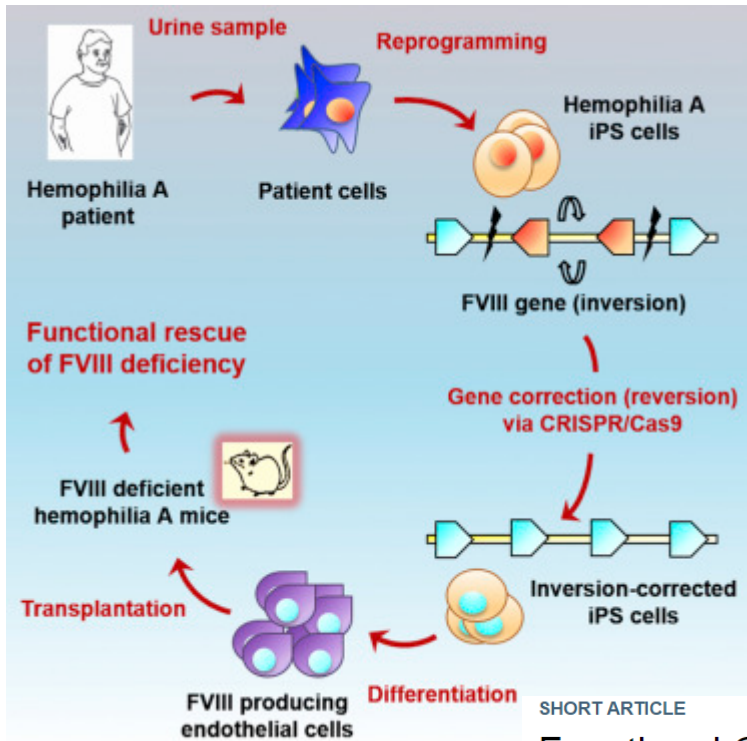
Long *et al.* apply genome editing to “correct” the disease-causing mutation in mice genetically destined to develop the disease. This germline editing strategy kept muscles from degenerating, even in mice harboring only a small percentage of corrected cells. Although not feasible for humans, this proof of concept sets the stage for applying genome editing to specific cell types involved in the disease.

Curare l'emofilia?

CRISPR/Cas9-mediated somatic correction of a novel coagulator factor IX gene mutation ameliorates hemophilia in mouse

Yuting Guan, Yanlin Ma, Qi Li, Zhenliang Sun, Lie Ma, Lijuan Wu, Liren Wang, Li Zeng, Yanjiao Shao, Yuting Chen, Ning Ma, Wenqing Lu, Kewen Hu, Honghui Han, Yanhong Yu, Yuanhua Huang, Mingyao Liu, Dali Li

Author Affiliations



SHORT ARTICLE

Functional Correction of Large Factor VIII Gene Chromosomal Inversions in Hemophilia A Patient-Derived iPSCs Using CRISPR-Cas9

Chul-Yong Park⁶, Duk Hyoung Kim⁶, Jeong Sang Son⁶, Jin Jea Sung, Jaehun Lee, Sangsu Bae, Jong-Hoon Kim⁷, Dong-Wook Kim⁷, Jin-Soo Kim⁷

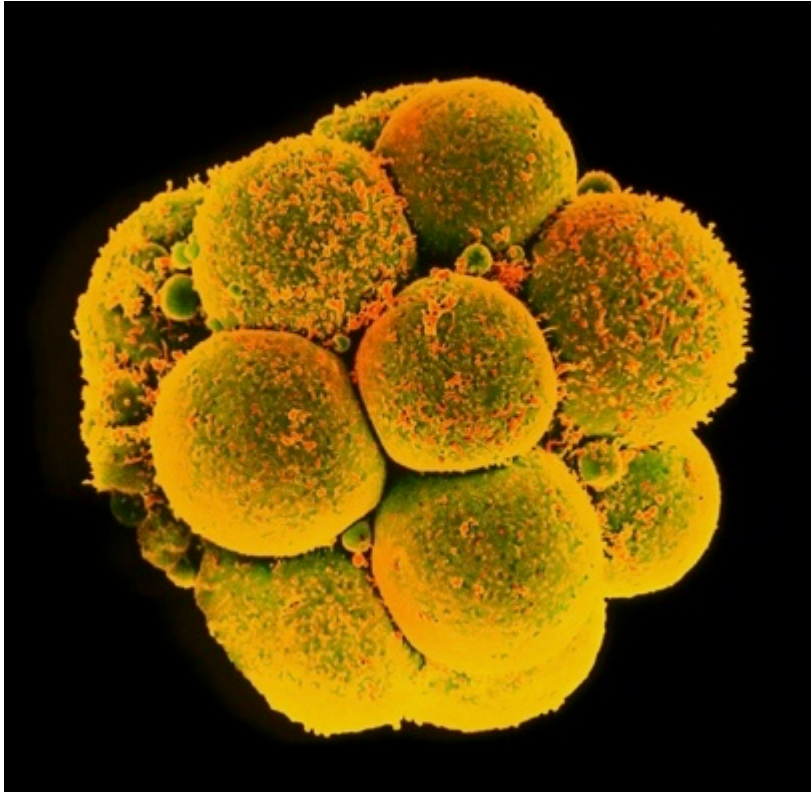
The X-linked genetic bleeding disorder caused by deficiency of coagulator factor IX, hemophilia B, is a disease ideally suited for gene therapy with genome editing technology.

These studies suggest that CRISPR/Cas-mediated *in situ* genome editing could be a feasible therapeutic strategy for human hereditary diseases, although an efficient and clinically relevant delivery system is required for further clinical studies.

Cell 2015

CRISPR debate fueled by publication of second human embryo–editing paper

By [Jocelyn Kaiser](#) | Apr. 8, 2016, 3:45 PM



NATURE | NEWS

Second Chinese team reports gene editing in human embryos

Study used CRISPR technology to introduce HIV-resistance mutation into embryos.

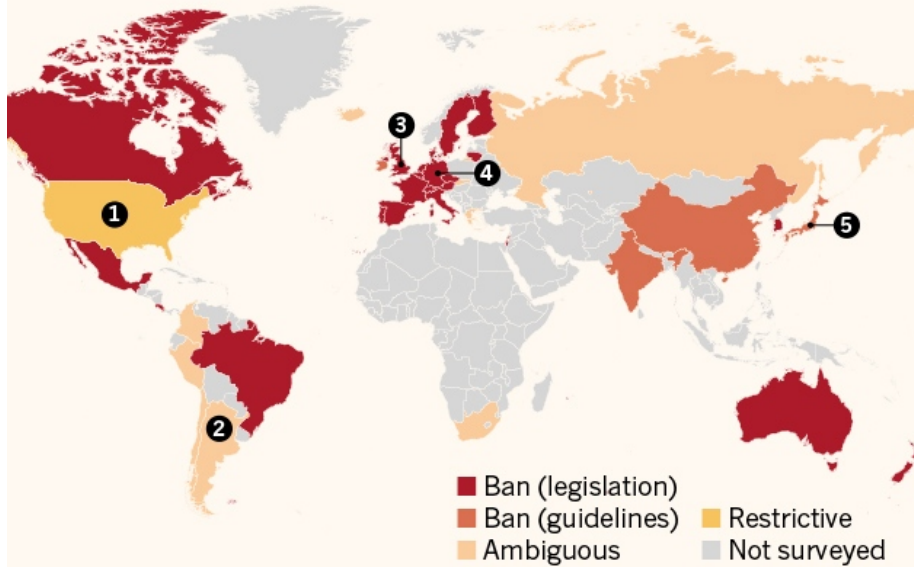
[Ewen Callaway](#)

A far scattare il cortocircuito tra ricerca scientifica ed etica è stato il passo compiuto da un gruppo di ricercatori cinesi che nell'aprile del 2015 ha annunciato di aver preso un'ottantina di embrioni umani (ancorché difettosi e destinati comunque a distruggersi) e di averli sottoposti al taglia e incolla per correggere il gene responsabile della talassemia.

L'esperimento, ripetuto un anno dopo per rendere gli embrioni resistenti all'Hiv, ha violato la moratoria che qualche mese prima gli stessi ricercatori pionieri della tecnica si erano autoimposti.

CRISPR EMBRYOS AND THE LAW

Regulations governing genetic modification in human embryos vary. Some countries ban the practice through legislation that carries criminal penalties; others have unenforceable guidelines.



1. THE UNITED STATES does not allow the use of federal funds to modify human embryos, but there are no outright genome-editing bans. Clinical development may require approval.

2. ARGENTINA bans reproductive cloning, but research applications of human-genome editing are not clearly regulated.

3. THE UNITED KINGDOM's independent Human Fertilisation and Embryology Authority may permit human-genome editing for research, but the practice is banned in the clinic.

4. GERMANY has strict laws on the use of embryos in assisted reproduction. It also limits research on human embryos, and violations could result in criminal charges.

5. JAPAN, like China, India and Ireland, has unenforceable guidelines that restrict the editing of a human embryo's genome.

Where in the world could the first CRISPR baby be born?

A look at the legal landscape suggests where human genome editing might be used in research or reproduction

Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering

Patrick D. Hsu,^{1,2,3} Eric S. Lander,¹ and Feng Zhang^{1,2,*}

¹Broad Institute of MIT and Harvard, 7 Cambridge Center, Cambridge, MA 02141, USA

²McGovern Institute for Brain Research, Department of Brain and Cognitive Sciences, Department of Biological Engineering, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139, USA

³Department of Molecular and Cellular Biology, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA

*Correspondence: zhang@broadinstitute.org

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>

GENETICA

Gran Bretagna, via libera alla modifica genetica di embrioni umani

Si studieranno i primi sette giorni di vita degli embrioni modificati (che non potranno essere impiantati in una donna). L'obiettivo degli scienziati è capire quali sono i geni cruciali per sviluppare bambini sani e prevenire aborti spontanei

UK scientists gain licence to edit genes in human embryos

Team at Francis Crick Institute permitted to use CRISPR-Cas9 technology in embryos for early-development research.