

Cos'è l'ingegneria genetica?

Consiste nell'utilizzo di tecniche sperimentali per produrre molecole di DNA che contengono nuovi geni o nuove combinazioni di geni

Le tecniche dell'ingegneria genetica coinvolgono spesso l'isolamento, la manipolazione e la reintroduzione del DNA all'interno di cellule eterologhe o, più nello specifico, di organismi modello

Cos'è l'ingegneria genetica?

Consiste nell'utilizzo di tecniche sperimentali per produrre molecole di DNA che contengono nuovi geni o nuove combinazioni di geni

Perchè?

- Per la ricerca pura molto utili per comprendere a fondo la funzione di una determinata proteina
- Per la ricerca applicata, il fine ultimo è quello di conferire a determinati organismi caratteristiche importanti per svolgere determinati scopi.

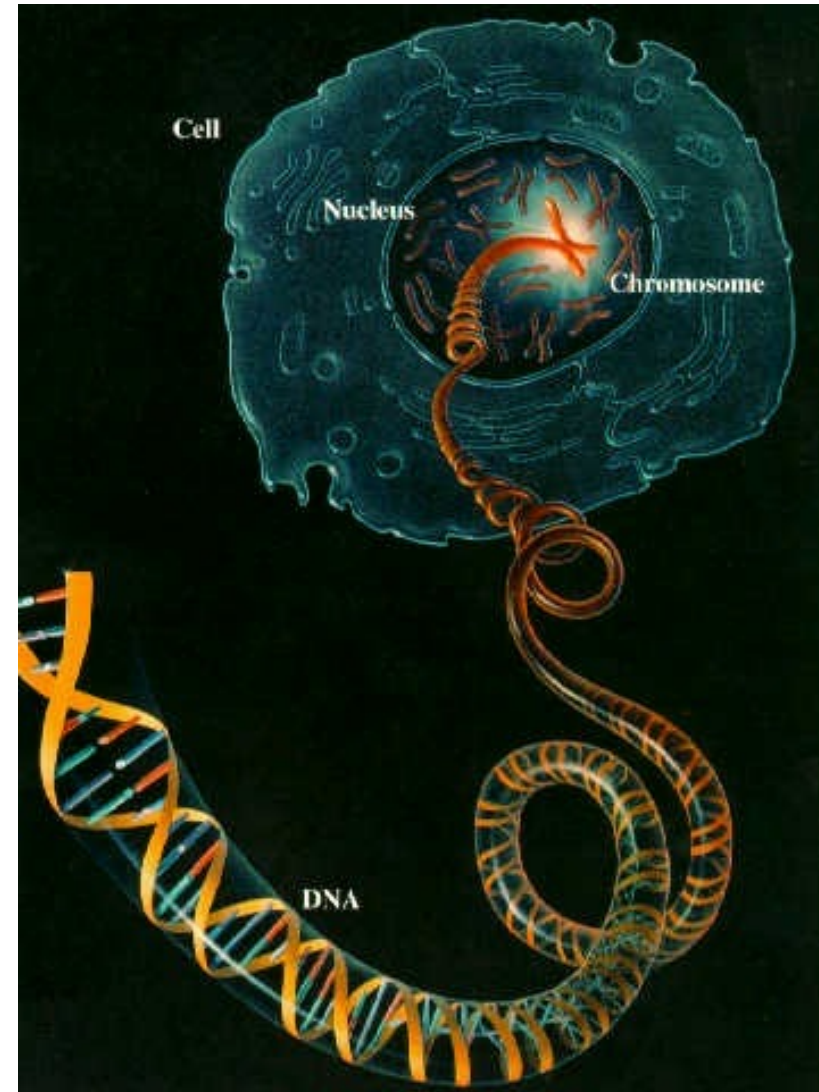


Agricolo: ad es. cereali resistenti agli erbicidi)

Biomedico: produzione di farmaci ricombinanti (ad es. la produzione di insulina attraverso batteri)

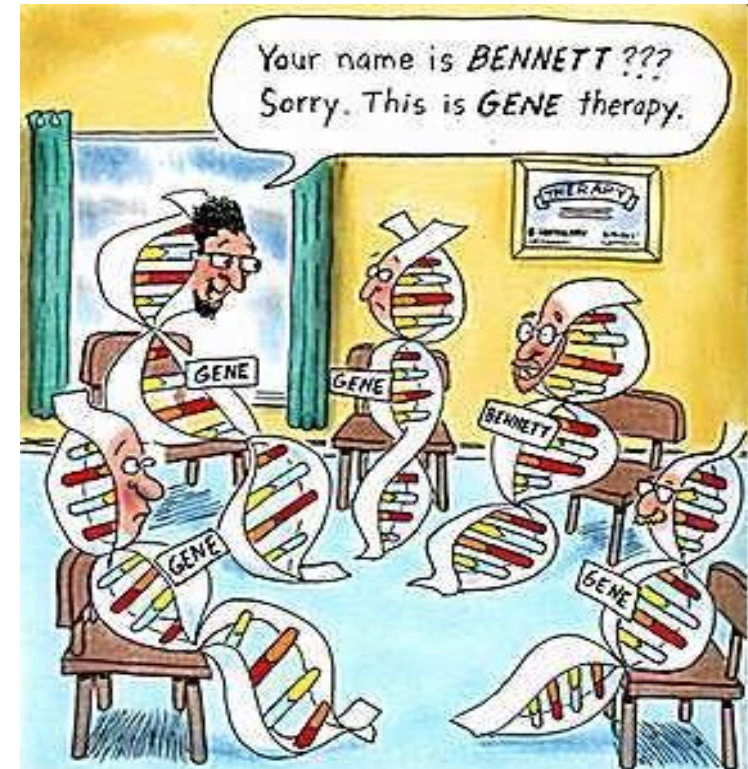
TERAPIA GENICA

- Introduzione di un transgene in una cellula allo scopo di correggere un errore innato del metabolismo o per fornire una nuova funzione cellulare o per neutralizzare un prodotto espresso dalla cellula

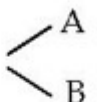


Terapia genica somatica: quali i migliori candidati?

- Malattie monogeniche, con ereditarietà recessiva o legata all'X
- Morbilità o mortalità significative: tumori e malattie cardiovascolari
- Terapia attuale inadeguata o non disponibile
- La sede cellulare del difetto genetico deve essere facilmente accessibile



Malattie monogeniche candidate all GT

Disease	Defect	Incidence	Target Cells
Severe combined immunodeficiency (SCID)	Adenosine deaminase (ADA) in 25% of SCID patients	Rare	Bone-marrow cells or T lymphocytes
Hemophilia 	Factor VII deficiency	1:10,000 males	Liver, muscle, fibroblasts or bone marrow cells
	Factor IX deficiency	1:30,000 males	
Familial hypercholesterolemia	Deficiency of low-density lipoprotein (LDL) receptor	1:1 million	Liver
Cystic fibrosis	Faulty transport of salt in lung epithelium	1:3000 Caucasians	Airways in the lungs
Hemoglobinopathies thalassemias	(Structural) defects in the α or β globin gene	1:600 in certain ethnic groups	
Gaucher's disease	Defect in the enzyme glucocerebrosidase	1:450 in Ashkenazi Jews	Bone marrow cells, macrophages
α_1 antitrypsin deficiency inherited emphysema	Lack of α_1 antitrypsin	1:3500	Lung or liver cells
Duchenne muscular dystrophy	Lack of dystrophin	1:3000 males	Muscle cells

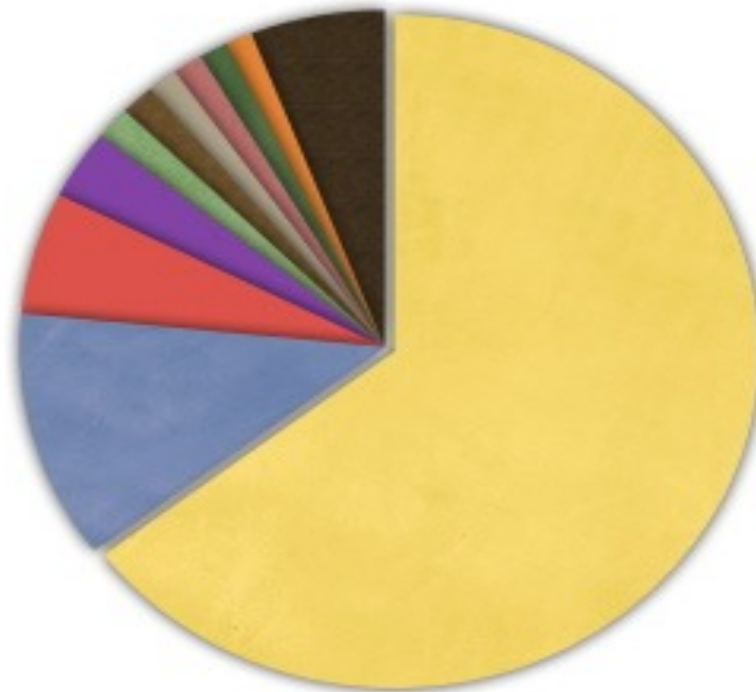
Malattie ad alta mortalita' candidate alla GT

Some Acquired Diseases that are Candidates for Gene Therapy

Disease	Defect	Incidence	Target Cells
Cancer	Many causes, including genetic and environmental	1 million/year in USA	Variety of cancer cell types, in liver, brain, pancreas, breast, kidney
Neurological diseases	Parkinson's, Alzheimer's spinal-cord injury	1 million Parkinson's and 4 million Alzheimer's patients in the USA	Neurons, glial cells, Schwann cells
Cardiovascular	Restenosis, arteriosclerosis	13 million in USA	Arteries, vascular endothelia walls
Infectious diseases	AIDS, hepatitis B	Increasing numbers	T cells, liver, macrophages
Rheumatoid arthritis	Autoimmune inflammation of joints	Increasing numbers with aging population	

Chi investe in terapia genica?

Geographical Distribution of Gene Therapy Clinical Trials
(by Country)

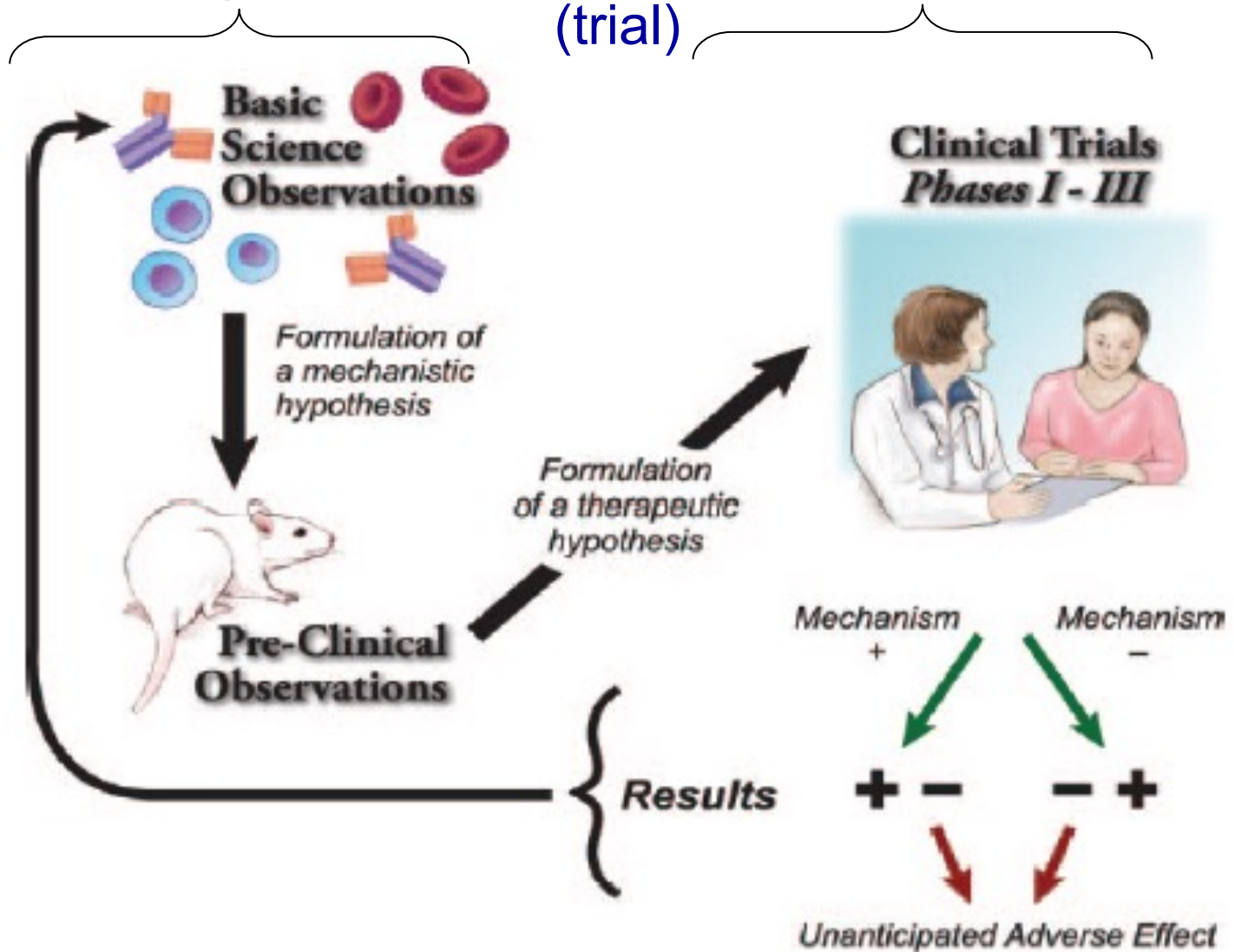


- USA 65% (n=815)
- UK 12% (n=150)
- Germany 5.9% (n=74)
- Switzerland 3.3% (n=42)
- France 1.6% (n=20)
- Belgium 1.5% (n=19)
- Australia 1.3% (n=17)
- Canada 1.3% (n=17)
- Japan 1.3% (n=16)
- Italy 1.2% (n=15) ←
- Others 5.9% (n=75)

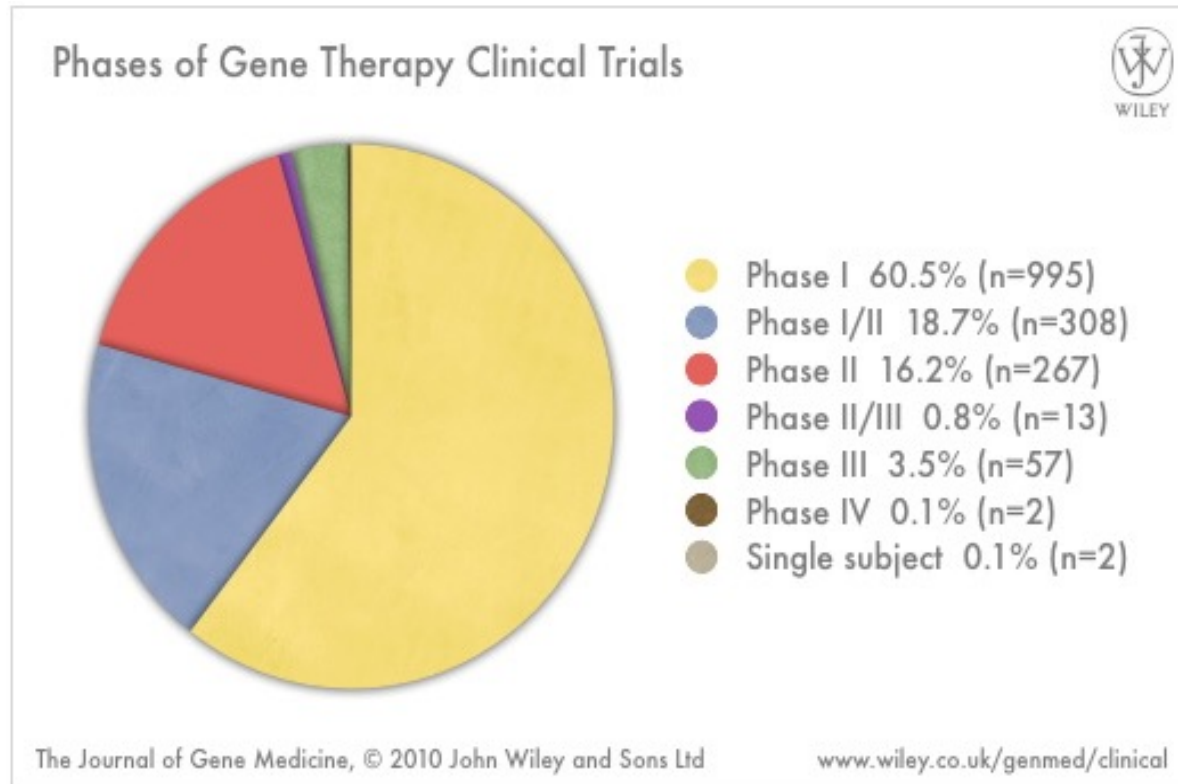
Sviluppo di una nuova terapia

Ricerca pre-clinica

Sperimentazione clinica
(trial)



Trial clinici in GT



Una sperimentazione clinica (clinical trial) e' caratterizzata da diverse fasi:

- **Fase I** (quanto farmaco può essere somministrato senza causare effetti avversi gravi?)
- **Fase II** (valutare come funziona il farmaco, e continuare la valutazione sulla sicurezza di fase I, su un gruppo più ampio di volontari e pazienti)
- **Fase III** (Quando un farmaco è considerato efficace e sicuro, viene somministrato a un numero alto di pazienti)
- **Fase IV** (Detta anche sorveglianza Post-Marketing per trovare ogni evento avverso raro od a lungo tempo, su una più grande popolazione di pazienti)

Terapia genica: come?

ex vivo

Le cellule bersaglio sono prelevate dal paziente, modificate geneticamente in laboratorio e reintrodotte nello stesso individuo



- ✓ no problemi immunologici
- ✓ efficienza delle metodiche di trasduzione in vitro
- ✓ solo alcune malattie (immunologiche, ematologiche, metaboliche)

in situ

il transgene viene rilasciato localmente nel sito di azione mediante iniezione i.m. o intratumorale o per inalazione ecc...



- ✓ tumori localizzati; ✓
patol. dell'apparato
respiratorio; tessuto
cutaneo ecc...

in vivo

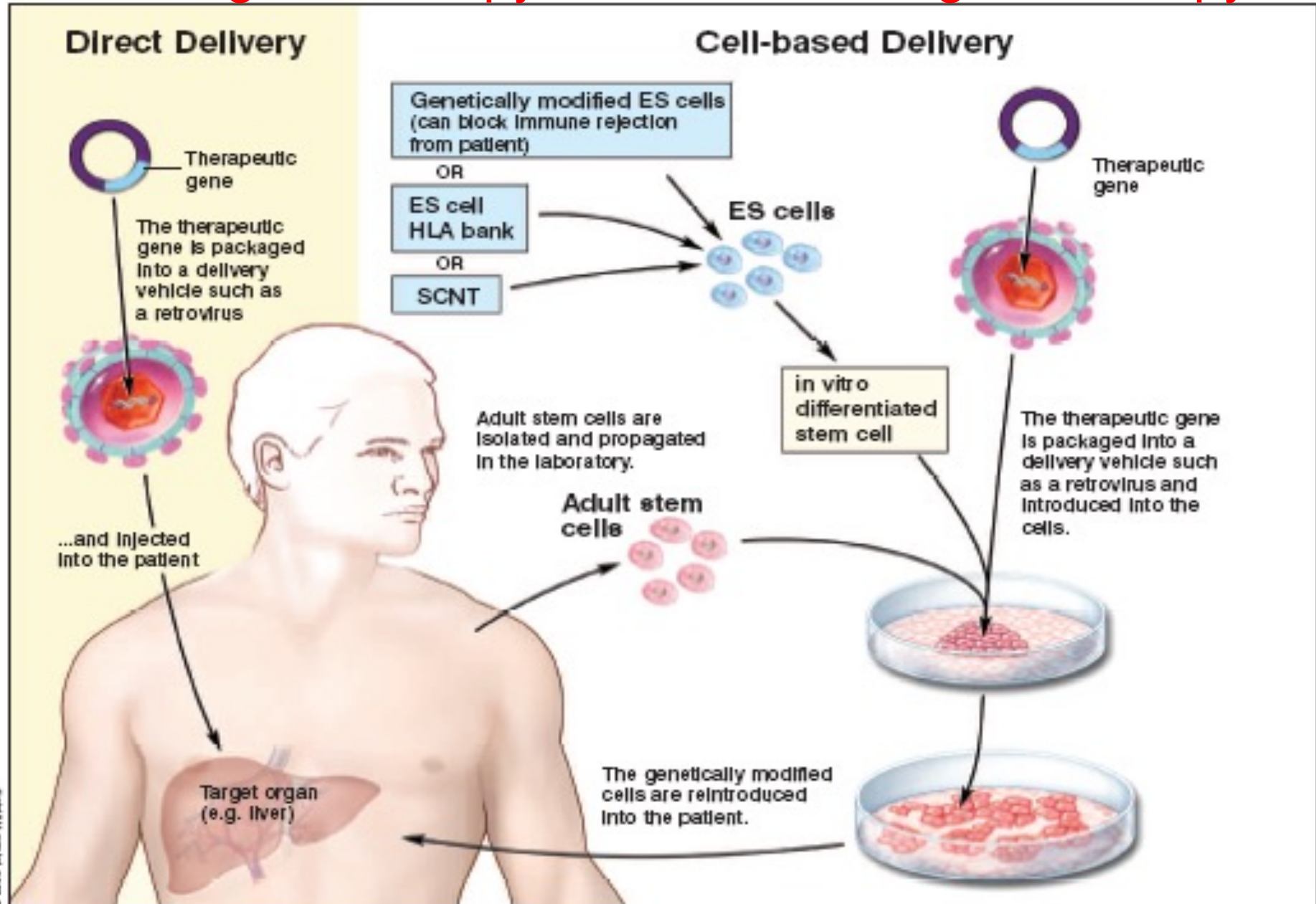
il transgene viene somministrato per via sistemica e.v. nel corpo del paziente



- cellule e tessuti poco accessibili
- ✓ scarsa efficienza di trasduzione, barriere

In vivo gene therapy

Ex vivo gene therapy



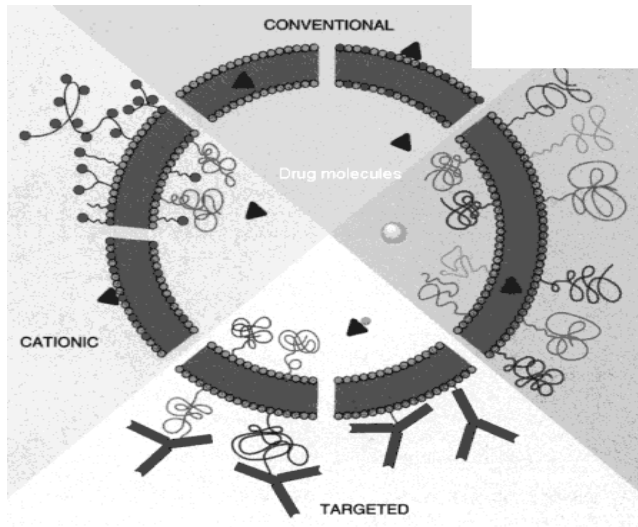
Tecniche di trasferimento genico

Lipofezione

Liposomi

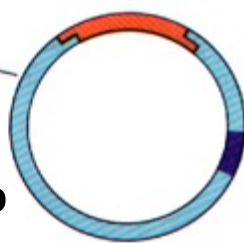
Lipidi cationici

Complessi liposomi/proteine



Recombinant
DNA molecule

DNA nudo



Vettori virali

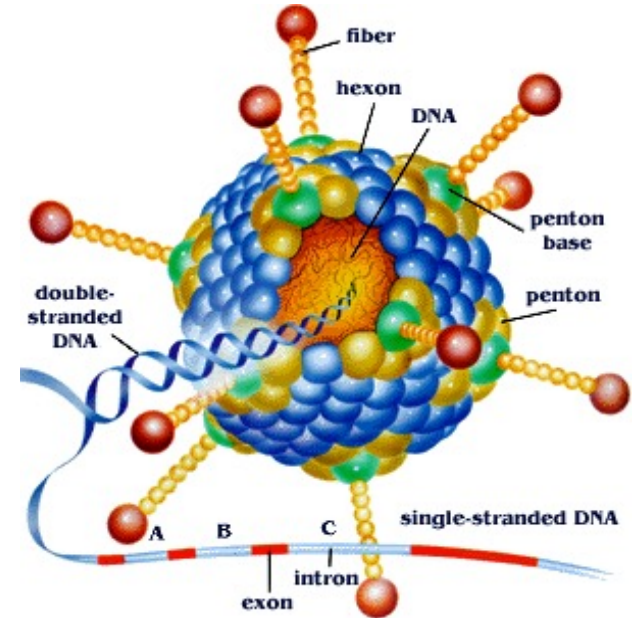
Retrovirus

Adenoviruses

Virus adeno-
associati (AAV)

Lentiviruses

Herpesviruses



Metodi fisici

Microiniezione

Elettroporazione

DNA complessato a nanoparticelle

Gene gun ("spara" nella cellula
particelle microscopiche
d'oro o tungsteno ricoperte
da DNA).

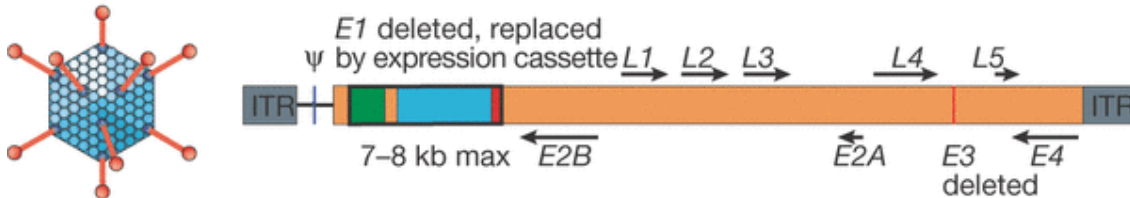


Vettore Virale ideale

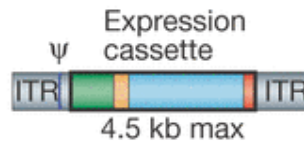
- ✓ di facile produzione e in elevate quantità
- ✓ esprimibile per un lungo periodo e regolabile
- ✓ sicuro, cioè inerte dal punto di vista immunologico
- ✓ selettivo per determinati tipi cellulari
- ✓ capace di trasportare geni piccoli e grandi
- ✓ capace di integrarsi in siti specifici del genoma
- ✓ capace di infettare sia cellule in divisione che quiescenti

Vettori virali

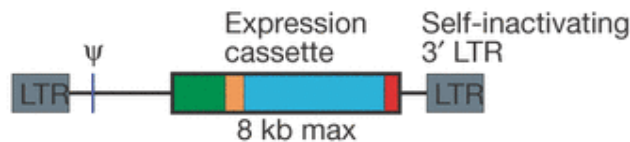
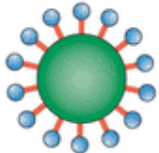
Adenovirus (~36 kb genome)



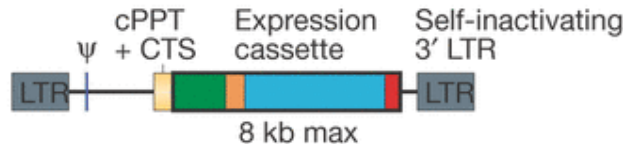
Adeno-associated virus (4.7 kb genome)



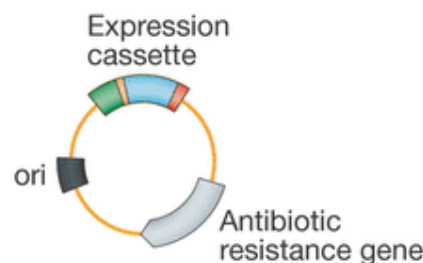
Retrovirus (7-10 kb genome)



Lentivirus (9-10 kb genome)



Liposome + plasmid (unlimited sized genome)



Vantaggi

- ✓ altamente efficienti nel trasferimento genico
- ✓ espressione a lungo-termine

Svantaggi

- ✓ reazione immunitaria
- ✓ tossicità
- ✓ integrazione random/mutagenesi inserzionale*

Adeno-associated virus (AAV)

Taxonomy

Family: Parvovirus

Subfamily: Parvoviridae

Genus: Dependovirus

Type: AAV 1-12

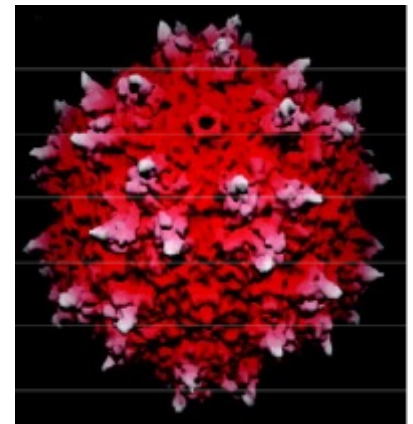
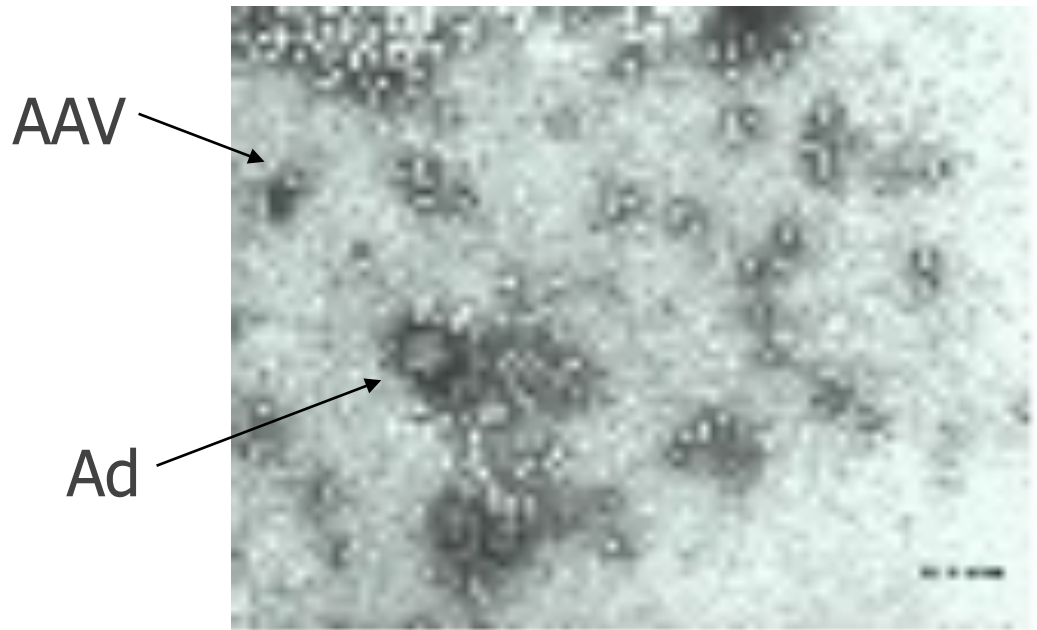
Morphology

Particles are icosahedral, non-enveloped, 18-26 nm diameter, 50% protein (VP1-3) 50% DNA. Resistant to inactivation by solvents, pH and heat.

Genome

Linear, non-segmented, ssDNA ~5 kb.

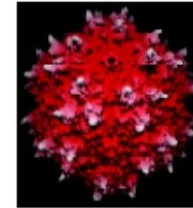
AAVs package equal amounts of (+) and (-) strands.



Xie et al. 2002

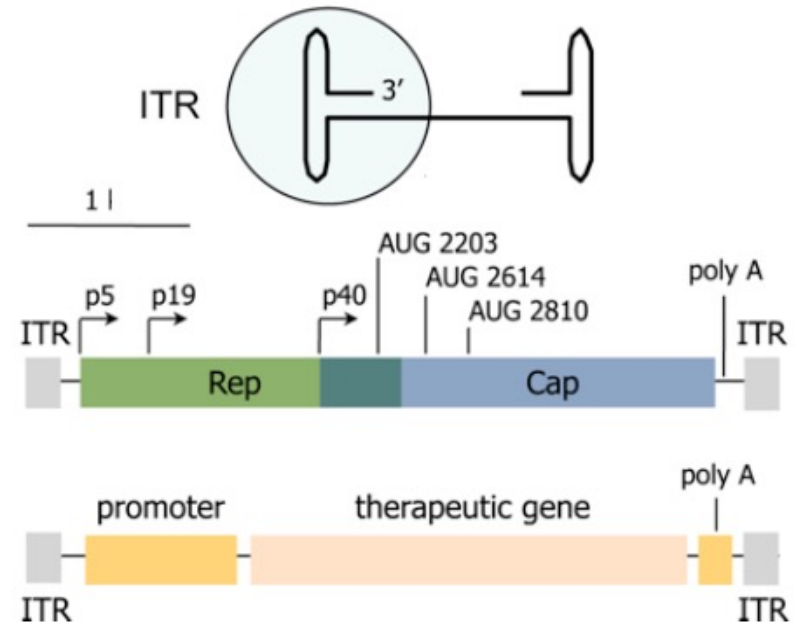
Gene transfer using Adeno-Associated Virus (AAV) vectors

1. Based on a widely diffused, non pathogenic virus
2. Vectors retain less than 10% of the viral genome
3. Vectors do not express any viral protein (not inflammatory and not immunogenic); long term ensured in vivo
4. Expression of the therapeutic gene can be driven by any desirable promoter
5. High titer vector preparations are obtained by virion purification
6. Mixing of different rAAV preparations results in the simultaneous expression of gene combinations in vivo

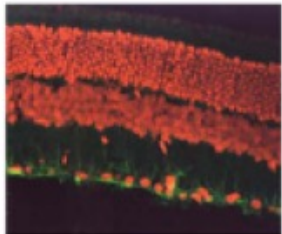


Xie et al. 2002

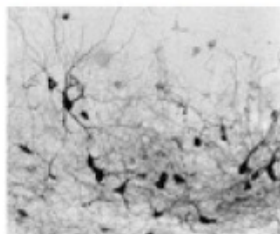
Family: Parvovirus
Genus: Dependovirus
Type: AAV 1-9
Size: 18-26 nm
Genome: ssDNA ~5 kb



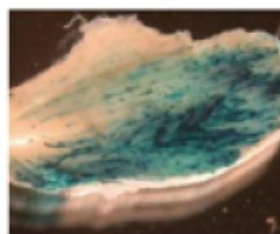
AAV vectors transduce with high efficiency post-mitotic tissues in vivo



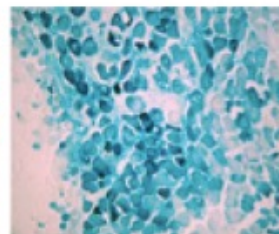
Retina, AAV2-GFP



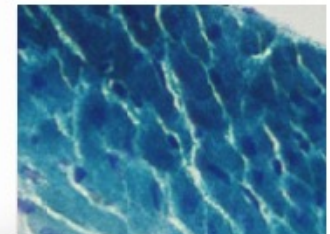
Brain, AAV2-bcl2



Muscle, AAV8-βgal



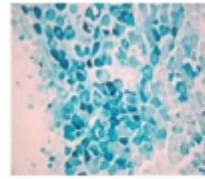
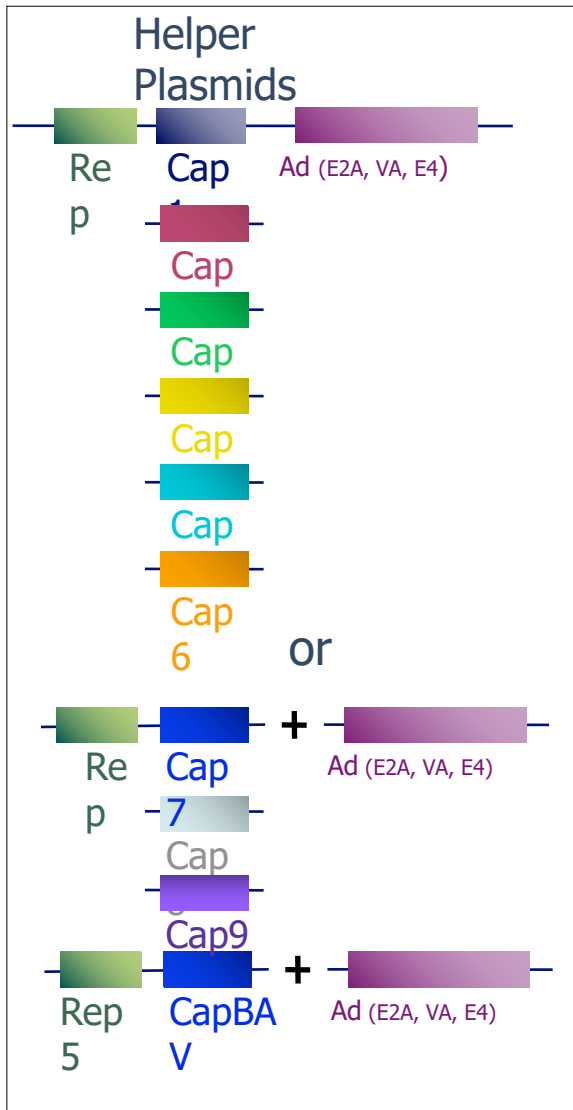
Heart, AAV9-βgal



Recettori di alcuni Parvovirus

Parvovirus	Recettore
AAV1	Acido sialico (legami α 2-3-N e α 2-6-N)
AAV2	Proteoglicani contenenti eparan-solfati (HSPG) Corecettori: integrina α v β 5, FGFR1, HGF-R
AAV3	Proteoglicani contenenti eparan-solfati (HSPG)
AAV4	Acido sialico (legami α 2-3-O)
AAV5	Acido sialico (legami α 2-3-O e α 2-3-N) Recettore del PDGF (PDGFR)
AAV6	Acido sialico (legami α 2-3-N e α 2-6-N)
AAV7	Non noto
AAV8	Recettore della laminina (LamR)
AAV9	Non noto (LamR?)
Parvovirus B19	Antigene P dei globuli rossi
CPV (parvovirus canino)	Recettore della transferrina Acido sialico (acido N-glicolil-neuraminico, NeuGC)
FPV (parvovirus della panleucopenia felina)	Recettore della transferrina

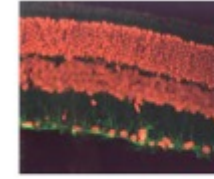
AAV efficiently transduces permissive tissues and promotes persistent transgene expression



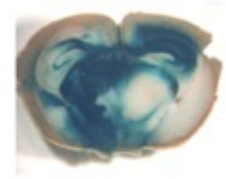
Skeletal muscle



Heart

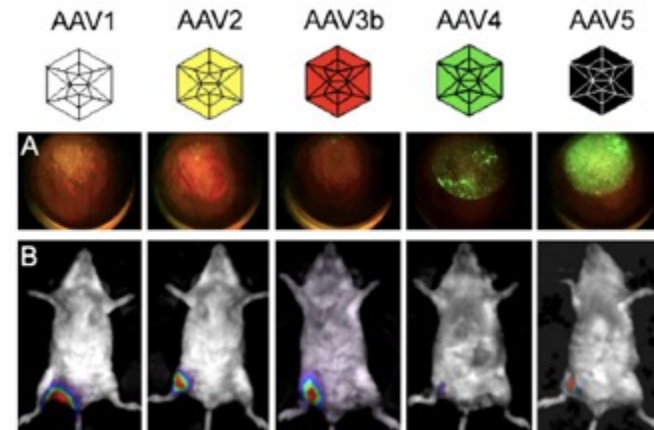
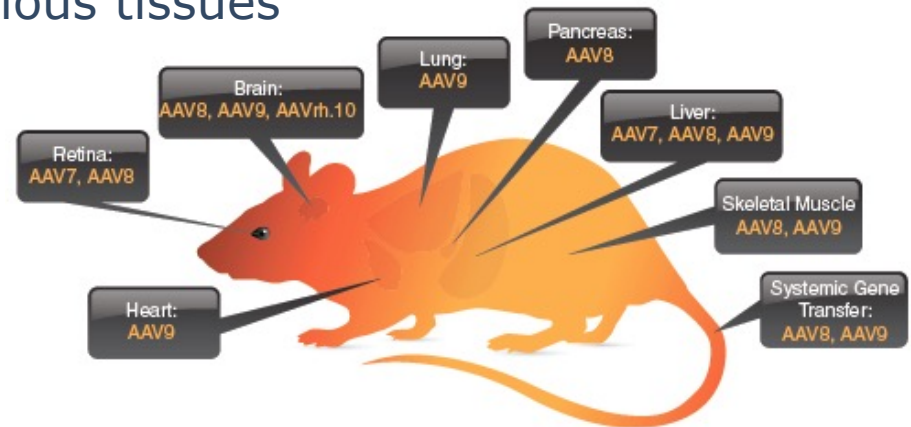


Retina



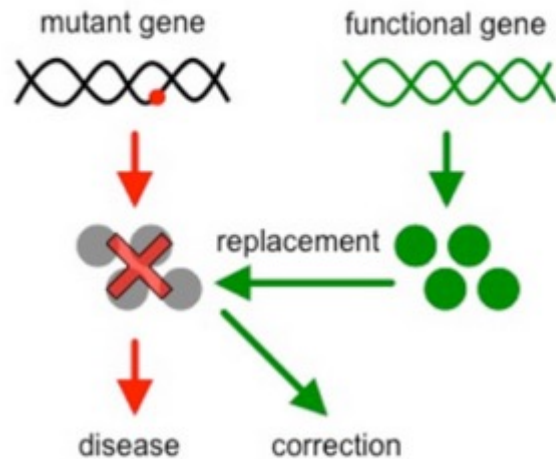
Brain

Optimal AAV serotypes for in vivo gene transfer to various tissues

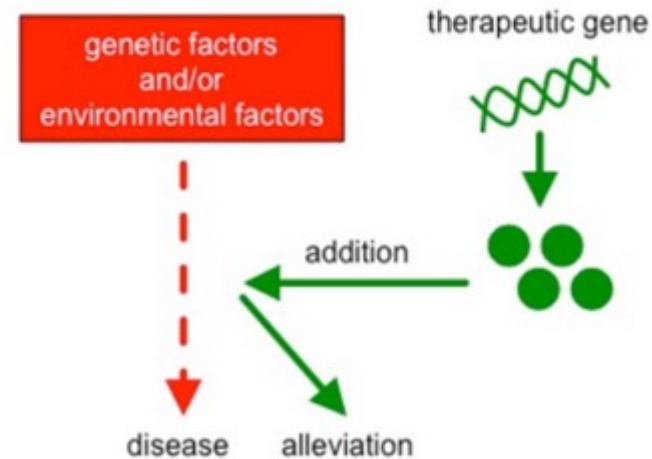


Four Gene Therapy Strategies

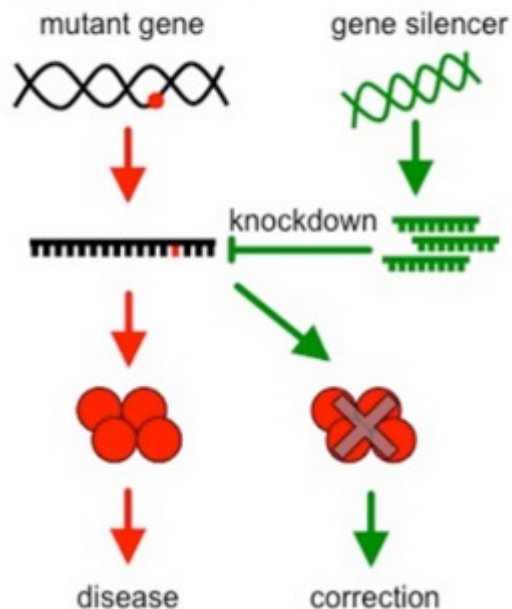
A. Gene replacement



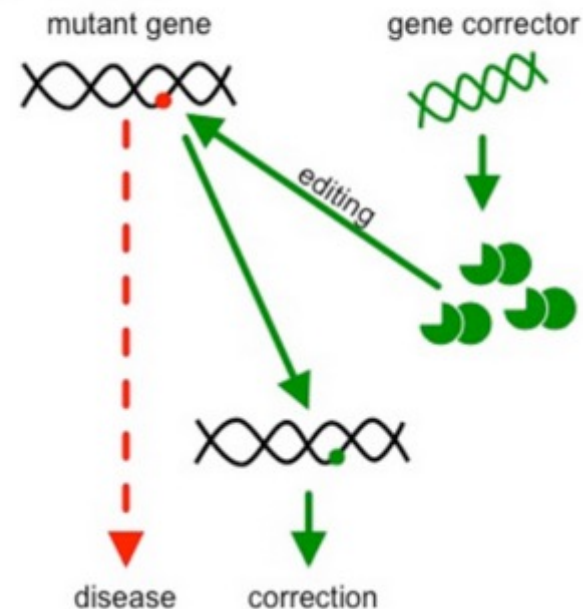
B. Gene addition



C. Gene knockdown



D. Gene editing



Peculiarities of the eye as a target for gene therapy

The eye is a site of immune-privilege

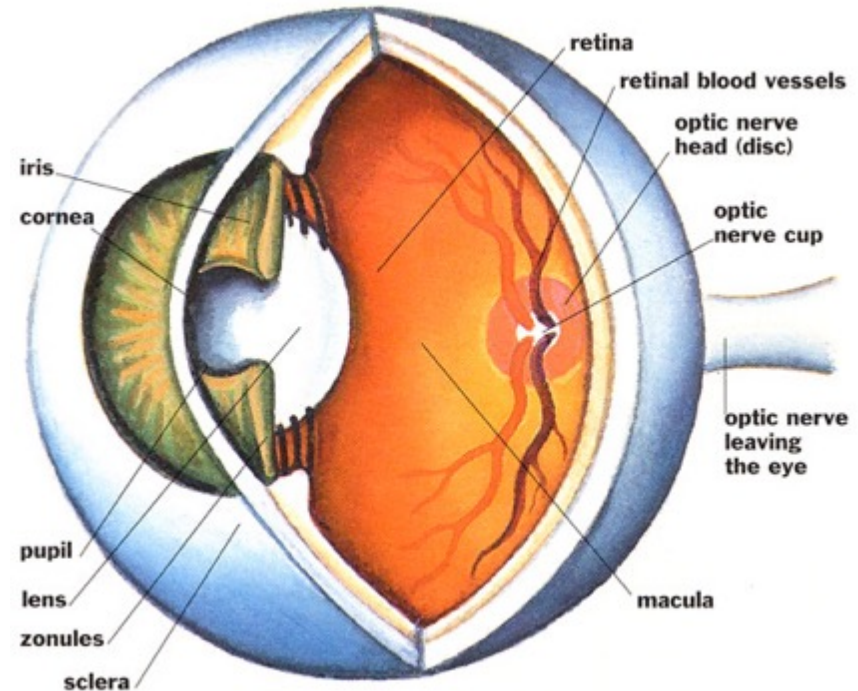
Most cells in the post-natal eye are terminally differentiated and prone to degenerative processes

Its compartmentalized anatomy (blood-retina barrier) enables local vector delivery in small volume with low likelihood of systemic dissemination

The eye is readily accessible for *in vivo* assessment by optical imaging and electrophysiological techniques

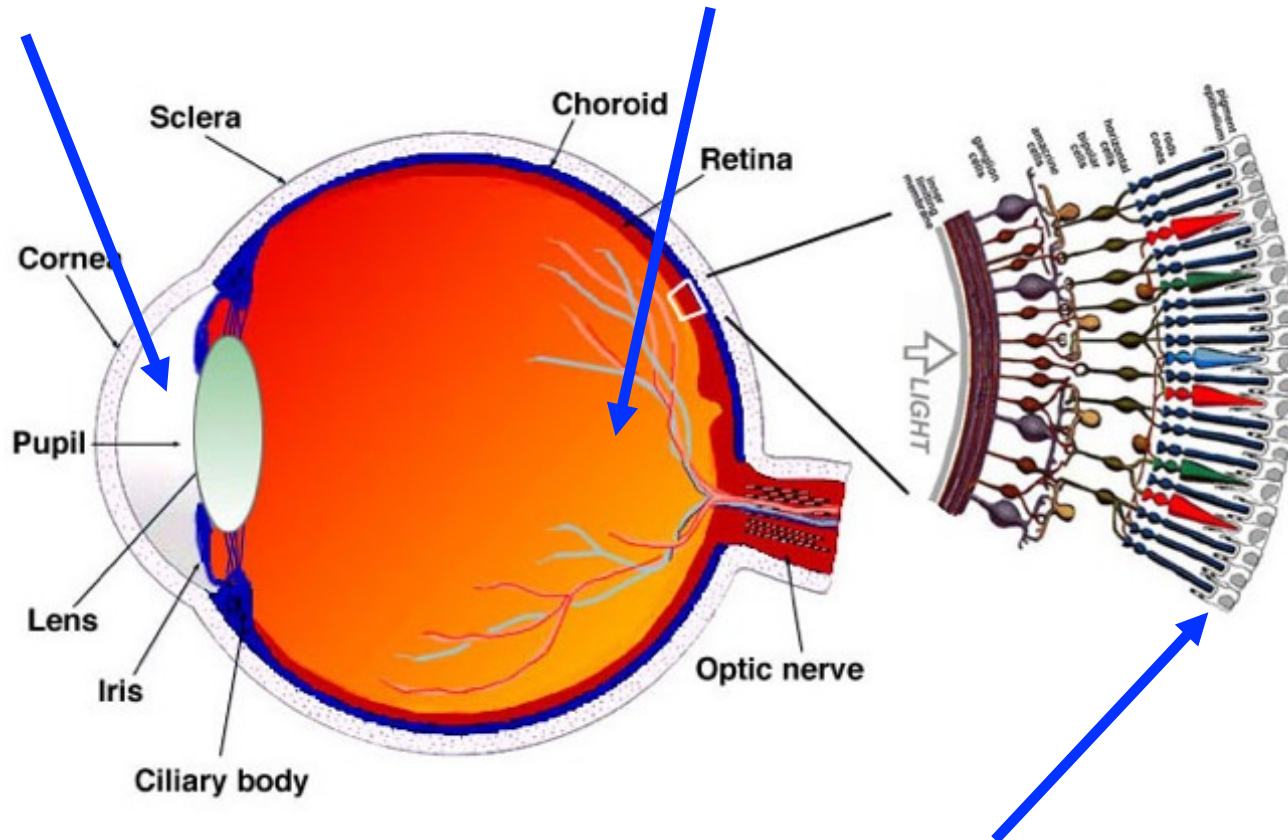
The results of the first clinical trials for ocular cancer and angiogenic disease have now been reported. One trial of gene replacement therapy for inherited retinal degeneration commenced recently and further such trials are expected to begin imminently

There are many animal models available



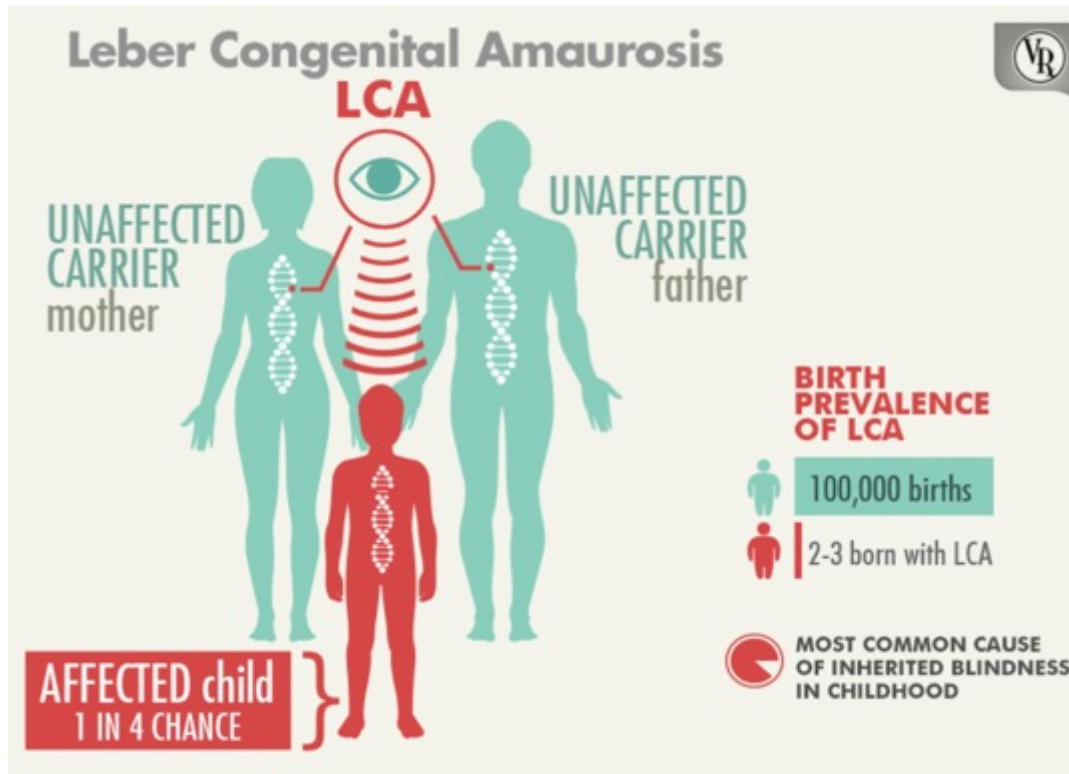
Into the anterior chamber - for corneal disease

Intravitreal - anti-apoptotic or neurotrophic genes to protect RGC death in glaucoma



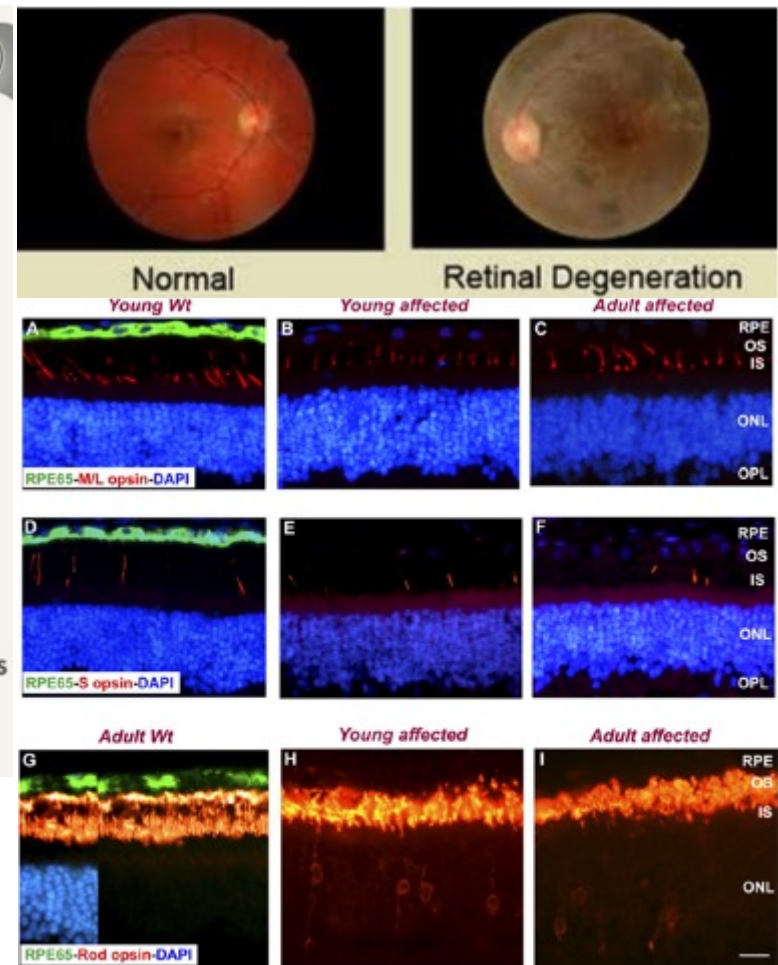
Sub-retinal (between photoreceptors and RPE) - for inherited retinal disorders, retinoblastoma and retinal neovascularization

Leber Congenital Amaurosis



Vision loss in IR patients is due to the dysfunction/degeneration of retinal photoreceptor cells (PRs; rods and cones) and/or the retinal pigment epithelium (RPE)

Mutations in more than a dozen genes can cause LCA and *RPE65*-LCA is thought to represent about 6% of all LCA cases



Leber Congenital Amaurosis due to RPE65 Mutations

Restoration of RPE65 in RPE cells is predicted to result in production of 11-cis-retinal and in reactivation of PR function

Excellent and consistent preclinical results obtained in small and large animal models

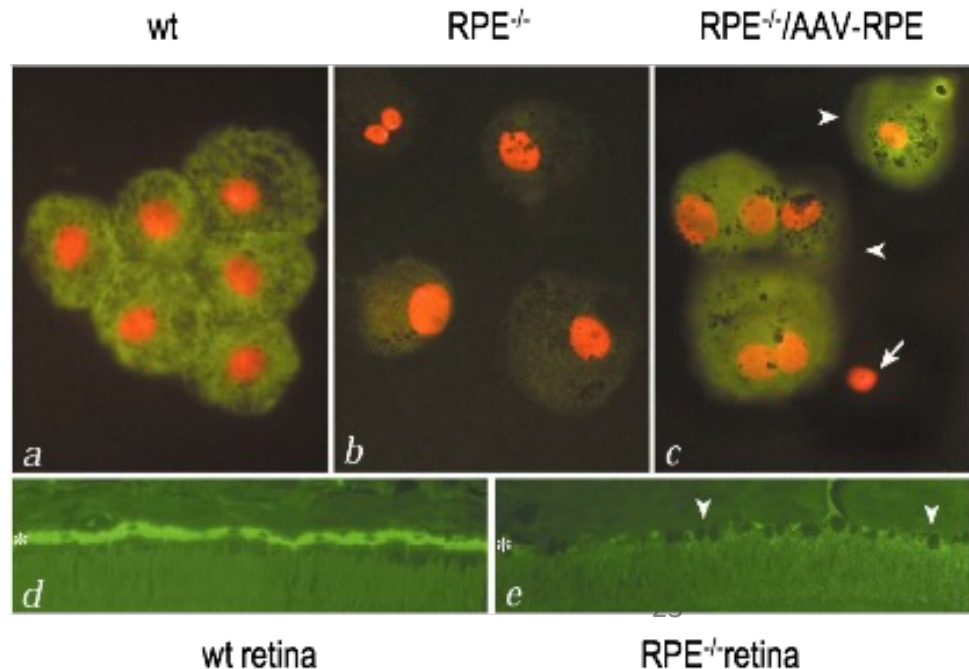
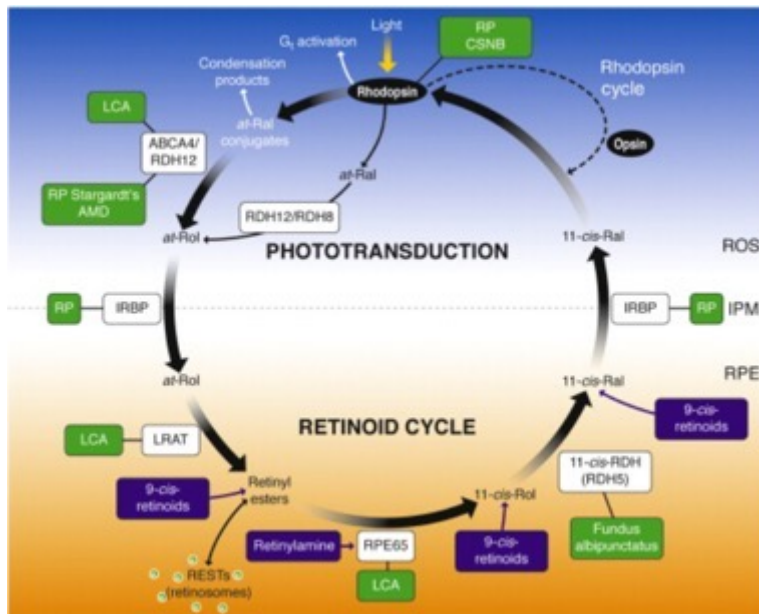
RPE65^{-/-} dogs bear a homozygous 4bp deletion resulting in a frameshift and a premature stop codon

 © 2001 Nature Publishing Group <http://genetics.nature.com>

letter

Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness

Gregory M. Acland¹, Gustavo D. Aguirre¹, Jharna Ray¹, Qi Zhang¹, Tomas S. Aleman², Artur V. Cideciyan², Susan E. Pearce-Kelling¹, Vibha Anand², Yong Zeng², Albert M. Maguire², Samuel G. Jacobson², William W. Hauswirth³ & Jean Bennett²



Safety in Nonhuman Primates of Ocular AAV2-*RPE65*, a Candidate Treatment for Blindness in Leber Congenital Amaurosis

SAMUEL G. JACOBSON,¹ SANFORD L. BOYE,² TOMAS S. ALEMAN,¹ THOMAS J. CONLON,³
CAROLINE J. ZEISS,⁴ ALEJANDRO J. ROMAN,¹ ARTUR V. CIDECIYAN,¹ SHARON B. SCHWARTZ,¹
ANDRAS M. KOMAROMY,⁵ MICHELLE DOOBRAJH,¹ ANDY Y. CHEUNG,¹
ALEXANDER SUMAROKA,¹ SUSAN E. PEARCE-KELLING,⁶ GUSTAVO D. AGUIRRE,⁵
SHALESH KAUSHAL,² ALBERT M. MAGUIRE,¹ TERENCE R. FLOTTE,³
and WILLIAM W. HAUSWIRTH^{2,3}



- No systemic toxicity, only modest local inflammation
- No photoreceptor abnormalities after AAV delivery

BRIEF REPORT

Safety and Efficacy of Gene Transfer for Leber's Congenital Amaurosis

Albert M. Maguire, M.D., Francesca Simonelli, M.D., Eric A. Pierce, M.D., Ph.D.,
Edward N. Pugh, Jr., Ph.D., Federico Mingozzi, Ph.D., Jeannette Bennicelli, Ph.D.,
Sandro Banfi, M.D., Kathleen A. Marshall, C.O.T., Francesco Testa, M.D.,
Enrico M. Surace, D.V.M., Settimio Rossi, M.D., Arkady Lyubarsky, Ph.D.,
Valder R. Arruda, M.D., Barbara Konkle, M.D., Edwin Stone, M.D., Ph.D.,
Junwei Sun, M.S., Jonathan Jacobs, Ph.D., Lou Dell'Osso, Ph.D.,
Richard Hertle, M.D., Jian-xing Ma, M.D., Ph.D., T. Michael Redmond, Ph.D.,
Xiaosong Zhu, M.D., Bernd Hauck, Ph.D., Olga Zelenai, Ph.D.,
Kenneth S. Shindler, M.D., Ph.D., Maureen G. Maguire, Ph.D., J. Fraser Wright, Ph.D.,
Nicholas J. Volpe, M.D., Jennifer Wellman McDonnell, M.S., Alberto Auricchio, M.D.,
Katherine A. High, M.D., and Jean Bennett, M.D., Ph.D.

- 3 patients in each study
- The procedure appear safe and might be beneficial - longer follow-up needed

BRIEF REPORT

Effect of Gene Therapy on Visual Function in Leber's Congenital Amaurosis

James W.B. Bainbridge, Ph.D., F.R.C.Ophth., Alexander J. Smith, Ph.D.,
Susie S. Barker, Ph.D., Scott Robbie, M.R.C.Ophth.,
Robert Henderson, M.R.C.Ophth., Kamaljit Balaggan, M.R.C.Ophth.,
Ananth Viswanathan, M.D., F.R.C.Ophth., Graham E. Holder, Ph.D.,
Andrew Stockman, Ph.D., Nick Tyler, Ph.D., Simon Petersen-Jones, Ph.D.,
Shomi S. Bhattacharya, Ph.D., Adrian J. Thrasher, Ph.D., M.R.C.P., F.R.C.P.,
Fred W. Fitzke, Ph.D., Barrie J. Carter, Ph.D., Gary S. Rubin, Ph.D.,
Anthony T. Moore, F.R.C.Ophth., and Robin R. Ali, Ph.D.

First AAV-Delivered Gene Therapy for Inherited Disease Approved by FDA



Luxturna is a recombinant adeno-associated virus of serotype 2 (rAAV2) expressing hRPE65. It is indicated for the treatment of patients with biallelic RPE65 mutation-associated retinal dystrophy.



One caveat: the injections cost \$850,000 USD for patient (both eyes), making it one of the most expensive treatments in the world

In 41 patients in the clinical program, a single dose of Luxturna restored functional vision in these patients—and in a way that they were now able to conduct activities of daily living independently. The latest data, presented at the American Academy of Ophthalmology, suggests that one dose at three years and counting is still showing a sustained effect.



LA VICENDA

Sofia, la bambina di Napoli curata con il farmaco più costoso al mondo

Ha 6 mesi e una malattia rara: per la terapia spesi 1,9 milioni. Il papà: «Per noi era un tunnel senza fine, finalmente ora possiamo sperare di vedere la luce»

di Fulvio Bufi



7 dicembre 2020

ZOLGENSMA



FARMACIA E BUSINESS

Novartis, il farmaco Zolgensma (atrofia spinale) diventa il più caro al mondo: costa 2,1 milioni di dollari

di Redazione Economia | 25 mag 2019



LOTTERIA ALL'ENASIMONE

Lotteria degli scontrini, come funziona: dal codice per giocare alle estrazioni

LE AGEVOLAZIONI

Rottamazione, «saldo e stralcio»: nuove scadenze per 1,2 milioni di italiani

PAGAMENTI DIGITALI

Arriva il Cashback senza «Spid» e senza «App Io». Come fare per ottenerlo

L'INDAGINE

Smart working: così l'azienda può monitorare i dipendenti

This website is intended for US residents only.

OneGene Program 855-441-GENE (4363)

[Important Safety Information](#)

[Prescribing Information](#)

[For Healthcare Professionals](#)



[About ZOLGENSMA ▼](#)

[Treatment With ZOLGENSMA ▼](#)

[About SMA ▼](#)

[Resources ▼](#)

[Sign Up](#)

[Starting ZOLGENSMA](#)

ZOLGENSMA targets the genetic root cause of SMA

As a gene therapy, ZOLGENSMA® (onasemnogene abeparvovec-xioi) is designed to target the genetic root cause of spinal muscular atrophy (SMA) by replacing the function of the missing or nonworking *SMN1* gene with a new, working copy of a human *SMN* gene. ZOLGENSMA does not change or become a part of the child's DNA.

To help you understand how this is possible, let's look at how ZOLGENSMA works.



SCROLL
▼



What is ZOLGENSMA?

ZOLGENSMA is a prescription gene therapy used to treat children less than 2 years old with spinal muscular atrophy (SMA). ZOLGENSMA is given as a one-time infusion into a vein. ZOLGENSMA was not evaluated in patients with advanced SMA.



***SMN1* gene missing or nonworking**

A targeted approach

ZOLGENSMA targets the genetic root cause of SMA by replacing the function of the missing or nonworking gene, called the *SMN1* gene. This gene is critical to making SMN protein.



controls muscles

functioning motor neuron cell

The importance of SMN protein

SMN protein is essential to motor neuron cell survival. These cells control muscle function. Without SMN protein, motor neuron cells die, causing muscles to become so weak that breathing, eating, and moving become difficult, and the condition is likely to become life threatening in its most severe forms.



The role of the vector

ZOLGENSMA is made up of a new, working copy of a human *SMN* gene that is placed inside a vector. A vector's job is to deliver the new, working *SMN* gene to the motor neuron cells in the body.



Delivery of the *SMN* gene

The vector that delivers the *SMN* gene is made from a virus called adeno-associated virus 9, or AAV9. This type of virus does not make people sick. To make the vector, the DNA of the virus is removed so that the new *SMN* gene can be put inside. Vectors are used because they can travel throughout the body and deliver the new, working gene to the cells where it is needed.



Production of SMN protein

When the new, working gene reaches its destination, it is ready to tell the motor neuron cells to start making SMN protein. This happens throughout the body, with many vectors delivering a new, working copy of the *SMN* gene to motor neuron cells. The new gene does not become part of the child's DNA.



Motor neuron cells maintained

With the motor neuron cells now able to make sufficient SMN protein, motor neuron cells that have not died may survive, function, and be maintained.



IRCCS materno infantile Burlo Garofolo

Regione Friuli Venezia Giulia

Cerca



2022, 7 ottobre: Atrofia muscolare spinale di tipo 1: prima terapia genica in FVG effettuata dell'equipe servizio Malattie rare del Burlo

Il bimbo trattato è arrivato da noi a quattro mesi di vita con malattia già in stadio avanzato e grave compromissione di deglutizione e respiro. Dopo il trattamento, il decorso della malattia è stato bloccato e il bimbo anche se avrà bisogno di una carrozzina elettronica e dovrà essere sottoposto a ventilazione notturna, non è più in pericolo di vita.

Come spiegano i membri dell'equipe del servizio malattie rare del Burlo, la terapia genica in questione è relativamente semplice, poiché si tratta dell'infusione per via endovenosa di un vettore virale adeno-associato (denominato AAV9) che trasporta il gene mancante SMN1 nel sistema nervoso centrale.

Si tratta, inoltre, di una terapia innovativa e ancora altamente costosa (oltre un milione di euro).

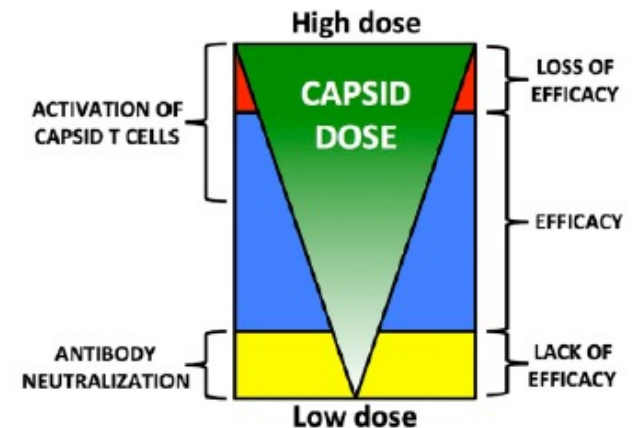
Long-Term Safety and Efficacy of Factor IX Gene Therapy in Hemophilia B

Amit C. Nathwani, M.B., Ch.B., Ph.D., Ulrike M. Reiss, M.D., Edward G.D. Tuddenham, M.B., B.S., Cecilia Rosales, Ph.D., Pratima Chowdhary, M.B., B.S., Jenny McIntosh, Ph.D., Marco Della Peruta, Ph.D., Elsa Lheriteau, Ph.D., Nishal Patel, F.R.C.P., F.R.C.Path., Deepak Raj, M.B., B.S., Ph.D., Anne Riddell, B.Sc., Jun Pie, B.S.N., Savita Rangarajan, M.B., B.S., David Bevan, M.B., B.S., Michael Recht, M.D., Yu-Min Shen, M.D., Kathleen G. Halka, M.D., Etiena Basner-Tschakarjan, M.D. Ph.D., Federico Mingozzi, Ph.D., Katherine A. High, M.D., James Allay, Ph.D., Mark A. Kay, M.D., Catherine Y.C. Ng, M.S., Junfang Zhou, M.D., Maria Cancio, M.D., Christopher L. Morton, B.S., John T. Gray, Ph.D., Deokumar Srivastava, Ph.D., Arthur W. Nienhuis, M.D., and Andrew M. Davidoff, M.D.
N Engl J Med 2014; 371:1994-2004 November 20, 2014 DOI: 10.1056/NEJMoa1407309

Dose-dependent increase in circulating factor IX to a level that was 1 to 6% of the normal value over a median period of 3.2 years, with observation ongoing

Reduction of more than 90% in both bleeding episodes and the use of prophylactic factor IX concentrate.

In 10 patients with severe hemophilia B, the infusion of a single dose of AAV8 vector resulted in long-term therapeutic factor IX expression associated with clinical improvement. With a follow-up period of up to 3 years, no late toxic effects from the therapy were reported.



ZOLGENSMA FOR SPINAL MUSCULAR ATROPHY



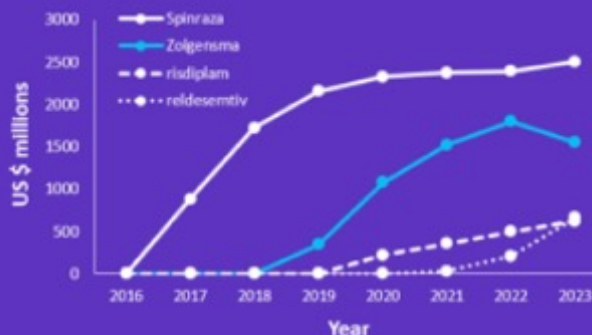
SMA is most often **LETHAL** in childhood

90% rate of death or permanent ventilation at two years of age in children with type 1 SMA



ALL of the children were **ALIVE** at two years in the pivotal trial of Zolgensma

Price: \$425,000 annually for five years = \$2.125 million



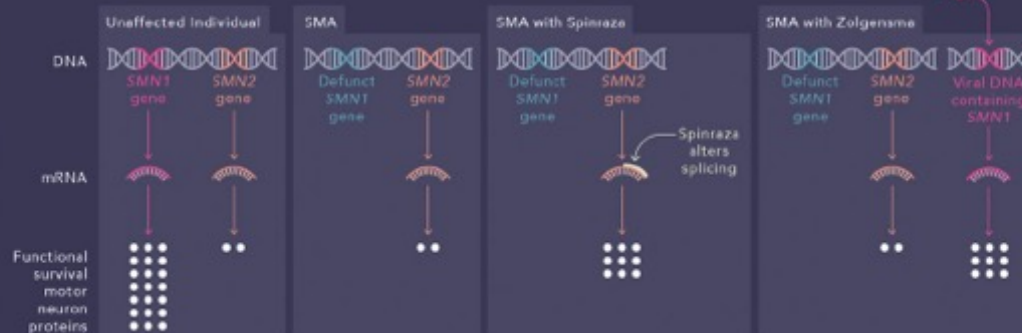
Spinraza: The first ever drug for SMA, but dosed every four months intrathecally

Risdiplam & reldesemtiv: two potential competitors currently in phase II/III trials

Zolgensma: the second SMA market entrant, but the first ever SMA gene therapy. Only requires a single intravenous dose



GENE THERAPY FOR SPINAL MUSCULAR ATROPHY (SMA)



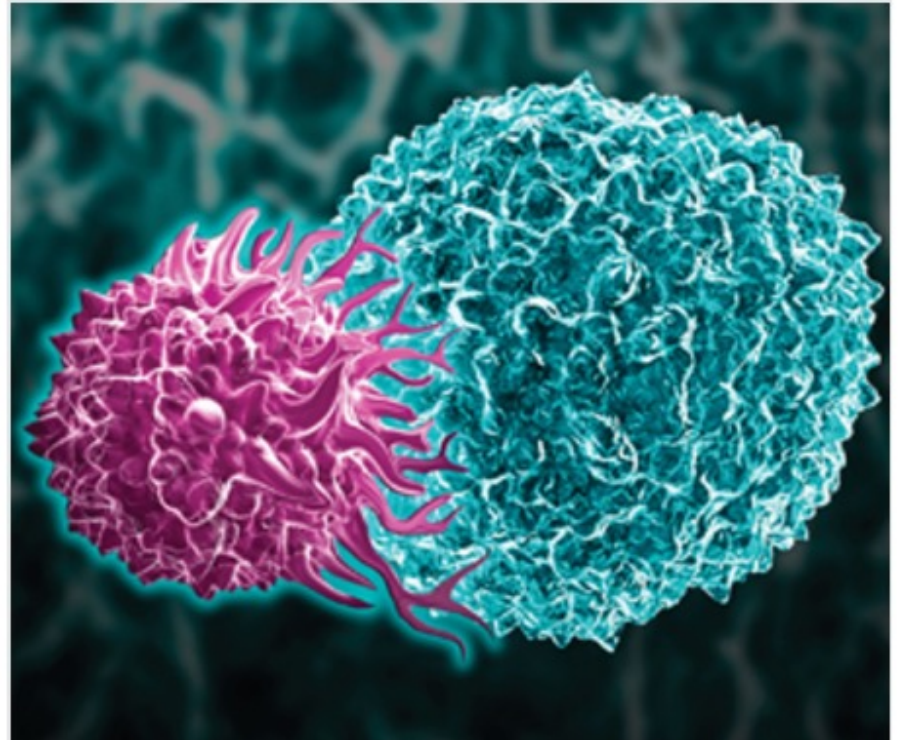
CAR-T cell therapy

Engineering Patients' Immune Cells to Treat Their Cancers

Chimeric antigen receptors
(CARs)

Adoptive cell transfer is like
“giving patients a living drug,”

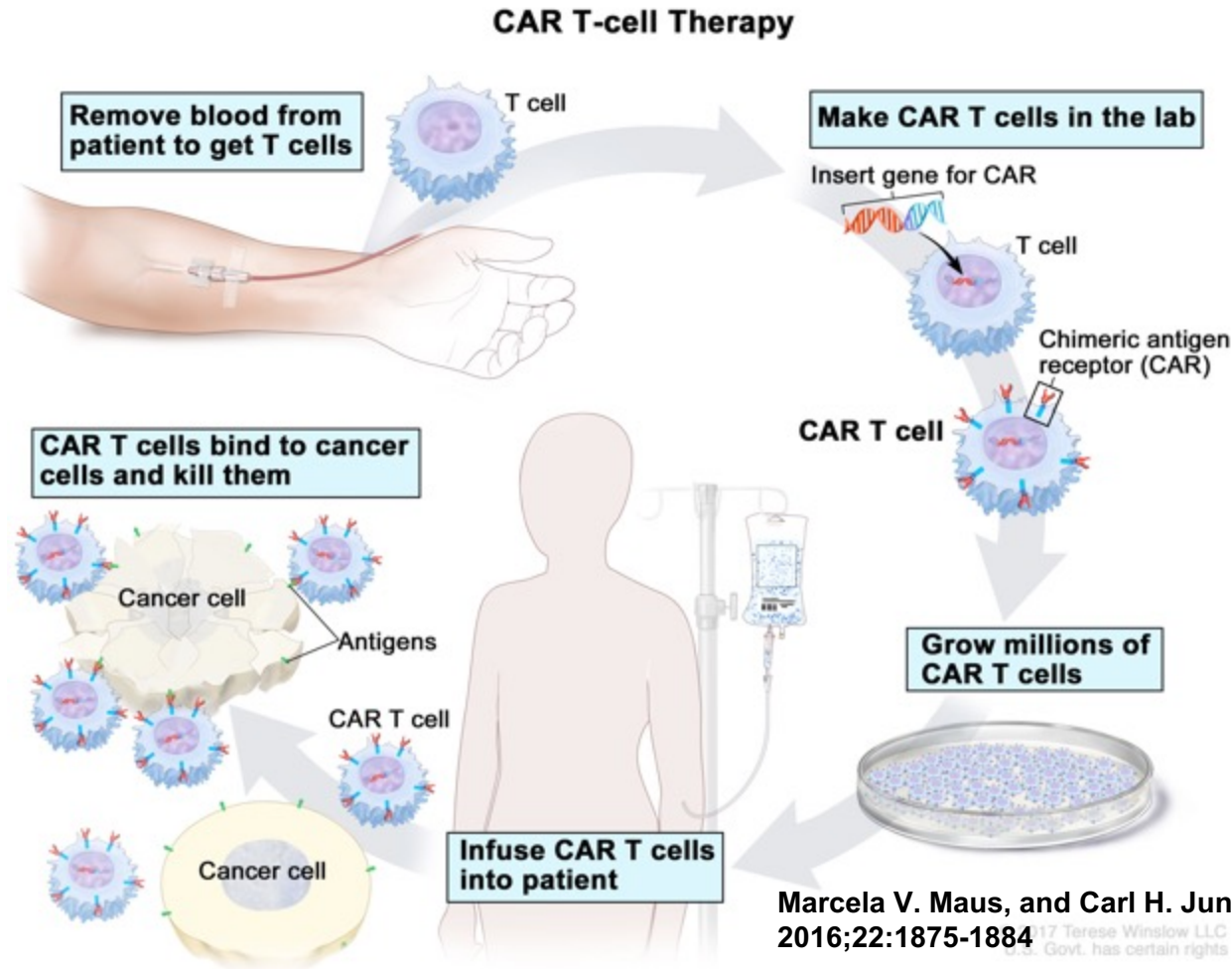
Immunotherapy—therapies
that harness the power of a
patient's immune system to
combat their disease,



© PHOTOTAKE Inc. / Alamy

A T cell engaging a tumor cell. Cancer treatments using CAR-T therapies lead to T cell expansion *in vivo*, which, unless carefully dosed, can release toxic levels of cytokines.

Overview of CAR T-cell therapy in the clinic.



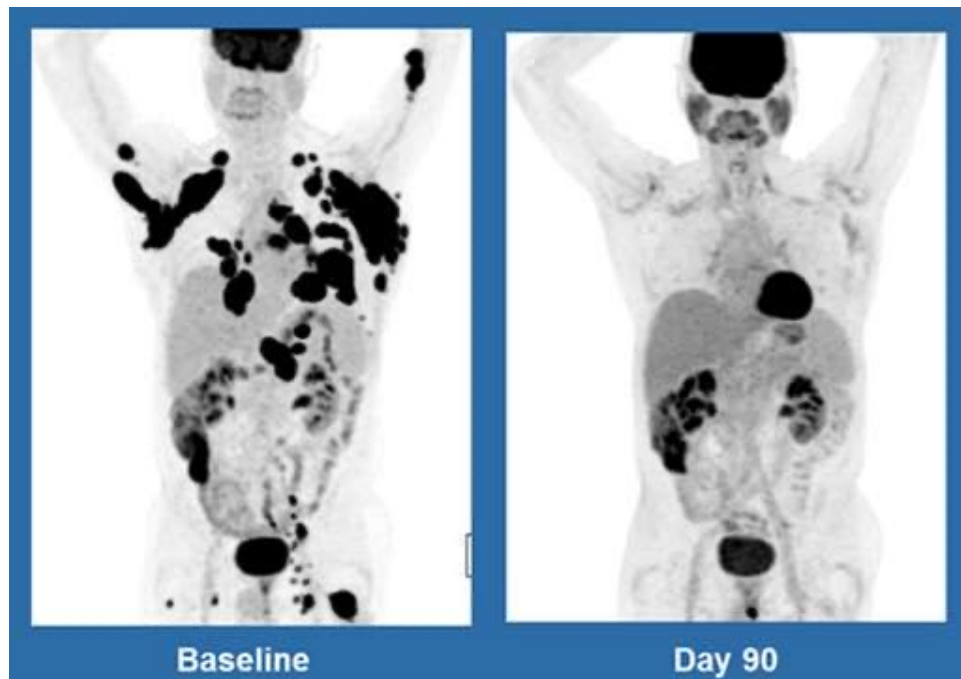
Cellule modificate.

Le Car-T si ottengono in laboratorio a partire da linfociti T del paziente, estratti con un prelievo e modificati geneticamente. La modifica, attuata tramite un vettore virale, inserisce in questi linfociti il gene del recettore [Car \(Chimeric Antigen Receptor\)](#), una proteina in grado di riconoscere specifiche strutture presenti sulla superficie del tumore. Le cellule modificate, ottenute in questo modo, vengono quindi fatte moltiplicare in vitro e reinfuse nel paziente, pronte ad attaccare e a eliminare il tumore

Amily Whitehead ha scritto la storia della medicina.

*Nel 2012 aveva sette anni, da due lottava contro una **leucemia linfoblastica acuta** contro cui nulla sembrava funzionare. Arrivò al Children's Hospital di Philadelphia il giorno dopo l'approvazione all'uso delle cellule Car-T in uno studio clinico umano: è stata la prima paziente a riceverle e il 10 maggio scorso ha festeggiato dieci anni liberi dal cancro.*

- Le terapie con Car-T hanno registrato il 30-40% di remissioni complete nei casi più complessi.
- Sono terapie iperpersonalizzate, perché il principio attivo si costruisce di volta in volta con le cellule del malato.
- Dal punto di vista dell'approvazione, sono gestite come i farmaci: nel 2019 la prima Car-T ha ricevuto il via libera in Italia e oggi le terapie rimborsate dal Servizio sanitario nazionale sono tre, per specifiche tipologie di leucemia linfoblastica acuta e linfoma e per pazienti in cui i trattamenti standard, come chemioterapia o trapianto, abbiano fallito.
- I centri autorizzati a somministrarle sono una trentina e devono garantire precisi requisiti
- La terapia con Car-T non è una strada per tutti: i linfociti T del paziente, per esempio, potrebbero essere poco efficienti o in numero non adeguato.
- Inoltre fra la raccolta delle cellule T e la loro reinfusione passano tre, quattro settimane: per alcuni la progressione della malattia può essere così rapida da non consentire una simile attesa.



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)

Le CAR-T autorizzate.

Le terapie CAR-T rappresentano la prima forma di terapia genica approvata per il trattamento della **leucemia linfoblastica B** e di alcune forme aggressive di **linfoma non-Hodgkin**. Finora l'EMA (European Medicines Agency) ha autorizzato due terapie con le cellule CAR-T (axicabtagene ciloleucel e tisagenlecleucel) che in entrambi i casi riconoscono l'[antigene](#) CD19, presente in diversi tumori del sangue.

- **Kymriah** (tisagenlecleucel), autorizzato il 22 agosto 2018
- **Yescarta** (axicabtagene ciloleucel), autorizzato il 23 agosto 2018,

indicate per il trattamento di:

- pazienti pediatrici e giovani adulti fino a 25 anni di età affetti da **leucemia linfoblastica acuta** a cellule B che non abbiano mai risposto alla chemioterapia, o che siano in recidiva dopo trapianto di cellule staminali emopoietiche allogeniche o dopo almeno 2 linee di chemioterapia (Kymriah);
- pazienti con **linfoma diffuso a grandi cellule B** o DLBCL (Kymriah e Yescarta) /linfoma primitivo del mediastino a cellule B o PMBCL (Yescarta) già sottoposti ad almeno 2 linee di terapia sistemica.

CAR-T: efficacia e sicurezza del trattamento

Rispetto alle terapie “convenzionali”, le CAR-T permettono di ottenere remissioni complete anche in fasi di malattia molto avanzate. Inoltre, a un anno dall’infusione di CAR-T, la maggior parte dei pazienti che ha ottenuto una remissione è ancora viva e libera da malattia.

Costi eccessivi.

Per un trattamento con Car-T si possono spendere anche 300.000 euro (se la terapia ha successo e la malattia è eradicata, si risparmia l'uso di altri farmaci che, per i tumori per cui sono approvate le Car-T, sono anch'essi molto costosi)

Produrre le Car-T "in casa"

oggi i linfociti T vanno congelati e spediti altrove, spesso negli Stati Uniti, per essere modificati in laboratori certificati.

Si stanno studiando vie alternative che prevedano l'uso di linfociti T freschi, trattati sul posto.

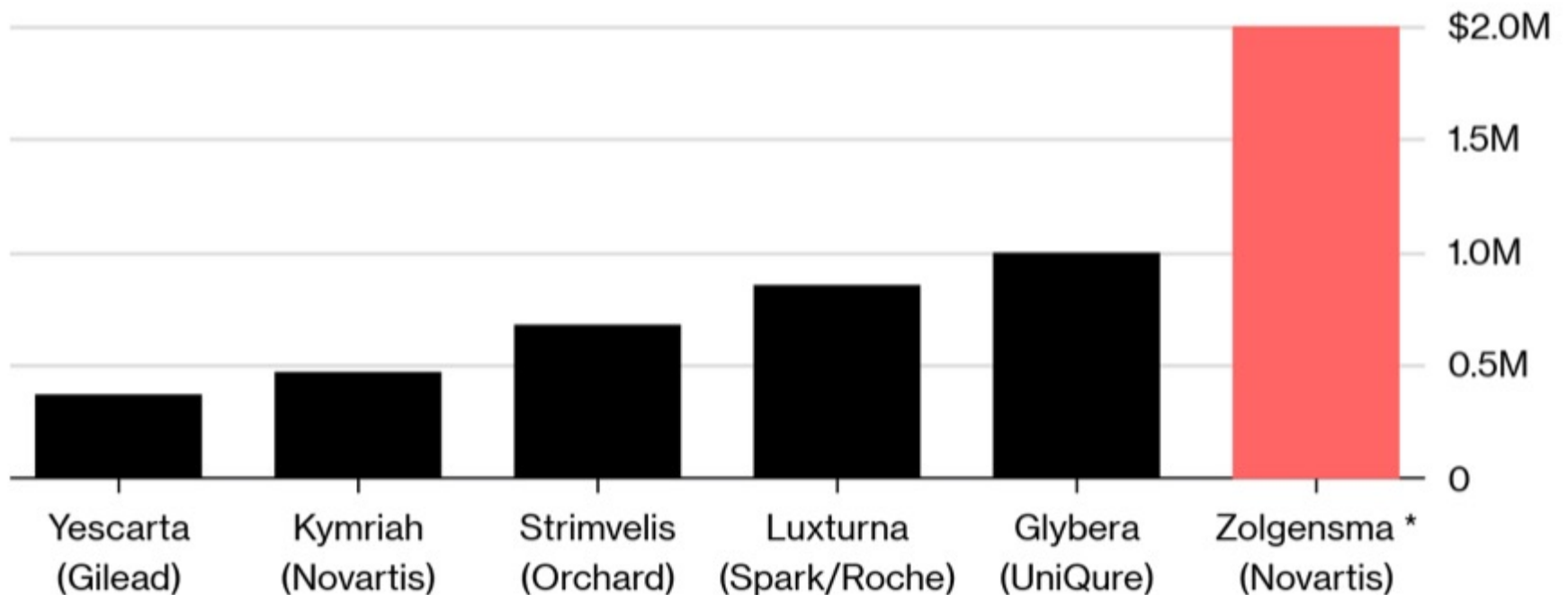
Al Bambino Gesù lo si sta facendo presso l'Officina farmaceutica dell'ospedale e nella sperimentazione clinica di fase I/II in corso sono stati già coinvolti undici bimbi. «Evitare il congelamento dei linfociti è un fattore positivo, inoltre la procedura è più rapida e per alcuni pazienti il tempo può essere un fattore decisivo.

Le strutture sanitarie abilitate alla somministrazione delle terapie avanzate sono 111, distribuite in tutte le regioni, ma quelle attive sono il 60% (65). Per quanto riguarda **i tempi medi di accesso**, a livello nazionale si parla di circa 300 giorni, con un divario tra le regioni del Centro-Nord (281) e quelle del Sud (333).

Pricing a Cure

The question for health systems: how much are one-time therapies worth?

■ Price in U.S. dollars



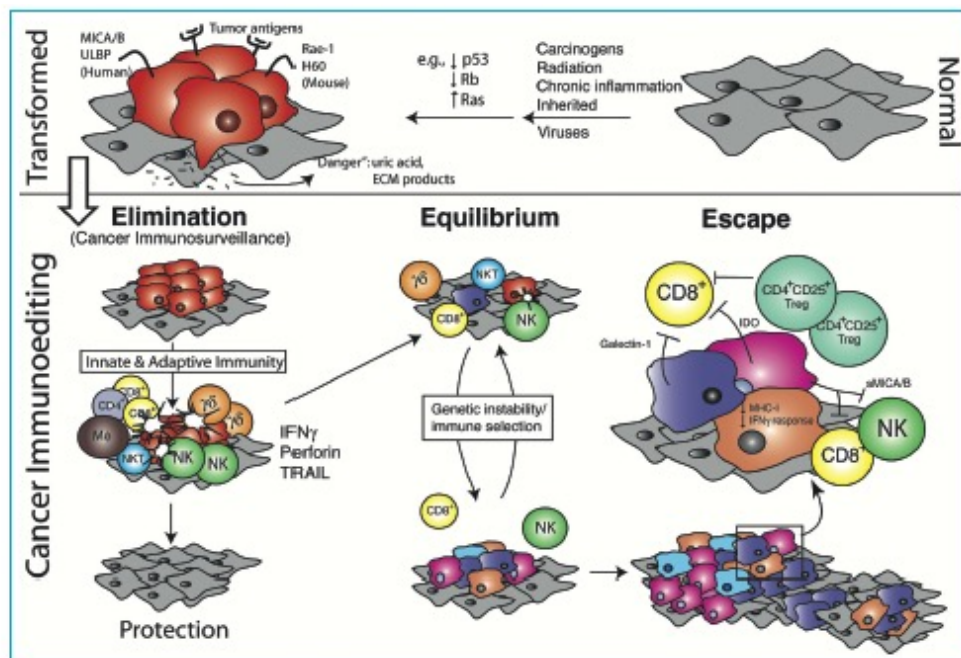
Zolgensma price is UBS assumption and hasn't been decided

Source: Bloomberg

Bloomberg

Obiettivo tumori solidi

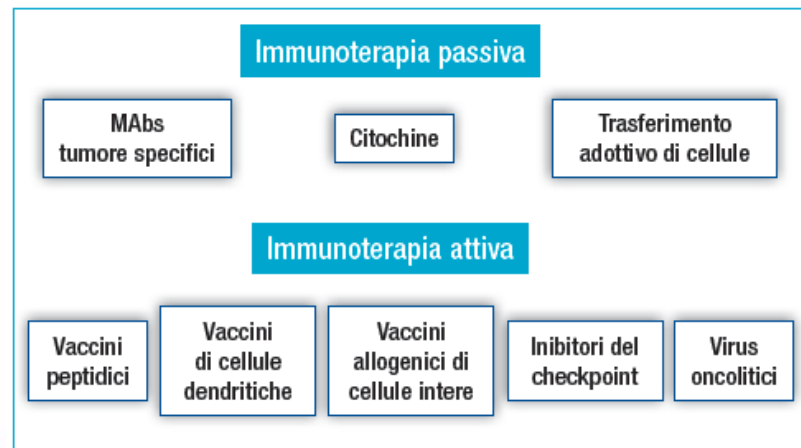
L'obiettivo dei ricercatori è puntare le Car-T non solo contro i tumori del sangue – come leucemie, linfomi e mieloma – ma anche contro i tumori solidi. Dal cancro alla prostata al carcinoma mammario, gli studi fervono ma sono ancora in fase iniziale perché, come spiega Franco Locatelli, «oltre a dover identificare il bersaglio giusto per ogni tipo di cancro, far arrivare i linfociti T in una massa solida è complicato. In più, il micro-ambiente attorno al tumore produce sostanze che depotenziano la risposta immune». Nonostante queste difficoltà qualche risultato è incoraggiante: al Bambino Gesù di Roma, per esempio, è in corso uno studio su bimbi con neuroblastoma, un tumore che nella metà dei casi è già metastatico alla diagnosi, o ha lesioni molecolari indicative di un decorso negativo. «Abbiamo realizzato Car-T dirette contro GD2, una proteina presente sulla superficie delle cellule di neuroblastoma, e abbiamo ottenuto una remissione a lungo termine nel 30-35% dei bimbi che avevano fallito tre, perfino cinque linee di terapia. In quelli con una patologia più limitata la probabilità di essere liberi da malattia a due anni dalla cura sale al 60%», conclude Locatelli.



L'immunoterapia in oncologia

Patrizia Giannatempo

Oncologo Medico, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milano



Diversi aspetti dell'immunità del tumore devono essere considerati per lo sviluppo di un trattamento immunoterapico:

- l'incapacità di prevedere l'efficacia del trattamento e la risposta del paziente;
- lo sviluppo della resistenza alle immunoterapie tumorali.

Fattori su cui agire per potenziare l'efficacia dei farmaci immunoterapici :

- la rimozione di segnali immunosoppressivi da parte delle cellule tumorali,
- l'induzione della morte delle cellule immunogeniche nei tumori,
- l'aumento dell'attività delle cellule che presentano l'antigene (APC);
- l'aumento delle funzioni effettrici delle cellule T.

GD2-CART01 for Relapsed or Refractory High-Risk Neuroblastoma

F. Del Bufalo, B. De Angelis, I. Caruana, G. Del Baldo, M.A. De Ioris, A. Serra, A. Mastronuzzi, M.G. Cefalo, D. Pagliara, M. Amicucci, G. Li Pira, G. Leone, V. Bertaina, M. Sinibaldi, S. Di Cecca, M. Guercio, Z. Abbaszadeh, L. Iaffaldano, M. Gunetti, S. Iacovelli, R. Bugianesi, S. Macchia, M. Algeri, P. Merli, F. Galaverna, R. Abbas, M.C. Garganese, M.F. Villani, G.S. Colafati, F. Bonetti, M. Rabusin, K. Perruccio, V. Folsi, C. Quintarelli, and F. Locatelli, for the Precision Medicine Team—IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù*

ABSTRACT

BACKGROUND

Immunotherapy with chimeric antigen receptor (CAR)–expressing T cells that target the disialoganglioside GD2 expressed on tumor cells may be a therapeutic option for patients with high-risk neuroblastoma.

METHODS

In an academic, phase 1–2 clinical trial, we enrolled patients (1 to 25 years of age) with relapsed or refractory, high-risk neuroblastoma in order to test autologous, third-generation GD2-CAR T cells expressing the inducible caspase 9 suicide gene (GD2-CART01).

RESULTS

A total of 27 children with heavily pretreated neuroblastoma (12 with refractory disease, 14 with relapsed disease, and 1 with a complete response at the end of first-line therapy) were enrolled and received GD2-CART01. No failure to generate GD2-CART01 was observed. Three dose levels were tested (3-, 6-, and 10×10⁶ CAR-positive T cells per kilogram of body weight) in the phase 1 portion of the trial, and no dose-limiting toxic effects were recorded; the recommended dose for the phase 2 portion of the trial was 10×10⁶ CAR-positive T cells per kilogram. Cytokine release syndrome occurred in 20 of 27 patients (74%) and was mild in 19 of 20 (95%). In 1 patient, the suicide gene was activated, with rapid elimination of GD2-CART01. GD2-targeted CAR T cells expanded in vivo and were detectable in peripheral blood in 26 of 27 patients up to 30 months after infusion (median persistence, 3 months; range, 1 to 30). Seventeen children had a response to the treatment (overall response, 63%); 9 patients had a complete response, and 8 had a partial response. Among the patients who received the recommended dose, the 3-year overall survival and event-free survival were 60% and 36%, respectively.

CONCLUSIONS

The use of GD2-CART01 was feasible and safe in treating high-risk neuroblastoma. Treatment-related toxic effects developed, and the activation of the suicide gene controlled side effects. GD2-CART01 may have a sustained antitumor effect. (Funded by the Italian Medicines Agency and others; ClinicalTrials.gov number, NCT03373097.)

The authors' full names, academic degrees, and affiliations are listed in the Appendix. Dr. Locatelli can be contacted at franco.locatelli@opbg.net or at the Department of Pediatric Hematology and Oncology and of Cell and Gene Therapy, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Piazza Sant'Onofrio, 4, 00165 Rome, Italy.

*The members of the Precision Medicine Team are listed in the Supplementary Appendix, available at NEJM.org.

Drs. Quintarelli and Locatelli contributed equally to this article.

N Engl J Med 2023;388:1284–95.
DOI: 10.1056/NEJMoa2210859
Copyright © 2023 Massachusetts Medical Society.

Quelle usate nello studio sono CAR T di terza generazione: le cellule ingegnerizzate contenevano una sorta di "interruttore di sicurezza", un gene suicida che blocca l'azione dei linfociti T in caso di effetti avversi gravi dell'immunoterapia. Siccome un comune è possibile effetto collaterale delle terapie a base di CAR-T è la sindrome da rilascio di citochine (febbre, ipotensione, ipossia) questo escamotage permette di eliminare rapidamente le CAR T infuse nel giro di qualche ora.

Neuroblastoma: che cos'è?

Il neuroblastoma è un tumore del sistema nervoso simpatico che ha origine dai neuroblasti, e può insorgere in diversi distretti corporei tra cui il più frequente è il surrene.

Si tratta del più comune tumore solido extra cranico nei bambini, responsabile dell'11% del totale delle morti per cancro in età pediatrica, e colpisce soprattutto i bambini di età inferiore ai 5 anni.

Quasi la metà dei pazienti presenta una malattia ad alto rischio già al momento della diagnosi e la sopravvivenza a cinque anni dalla diagnosi è del 40-50%.

I risultati.

- Lo studio ha valutato sia sicurezza e tollerabilità delle CAR T in vari dosaggi (fase 1), sia l'efficacia nella cura dei tumori e la permanenza delle cellule nell'organismo (fase 2).
- La terapia si è dimostrata sicura ed efficace.
- Il 63% dei pazienti (17 bambini e ragazzi) ha mostrato una risposta alla terapia e tra questi 9 sono andati in remissione completa.
- Cresce inoltre la probabilità di sopravvivenza fino a 3 anni (60% dei casi) e di sopravvivere senza evidenza di malattia (36%).
- Le CAR T persistono nell'organismo sino a 2-3 anni dall'infusione sostenendo l'efficacia della terapia.

A breve inizierà una sperimentazione in cui lo stesso tipo di cellule CAR T dirette contro la molecola target GD2 verrà utilizzato in pazienti pediatrici e giovani adulti affetti da vari tipi di tumore cerebrale.

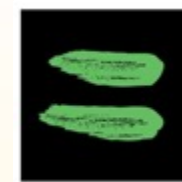
Qual è il percorso di un paziente per arrivare a ricevere un trattamento con cellule CAR-T?

In generale, i pazienti che hanno i requisiti di idoneità per il trattamento vengono indirizzati da uno specialista a un centro di trattamento CAR-T certificato. Il team degli esperti del centro valuta quindi la candidabilità del paziente alla terapia CAR-T. Nel caso specifico del mieloma multiplo, la recente indicazione dell'agenzia regolatoria europea EMA (European Medicinal Agency), definisce che la terapia CAR-T è indicata in pazienti che hanno già ricevuto almeno tre linee di trattamento (comprendenti un inibitore del proteosoma, un immunomodulante e un anticorpo monoclonale anti-CD38), nei quali la malattia sia andata in progressione durante l'ultimo trattamento.

A partire dalla sua esperienza, come avviene "l'arruolamento" del paziente?

In Regione Veneto esiste dal 2016 la Rete Ematologica Veneta (REV), che raggruppa tutte le strutture cliniche in Poli ematologici, ciascuno coordinato da centri ematologici di primo livello ("hub") che interagiscono con centri di secondo e terzo livello ("spoke"). L'UOC di Ematologia dell'AOUI Verona è il centro coordinatore del Polo Ematologico di Verona e Rovigo. Per il reclutamento dei pazienti candidati al trattamento con CAR-T ci avvaliamo di questa rete, ed i centri di secondo e terzo livello fungono così da centri *referral*. Ogni settimana abbiamo una riunione telematica di tutto il CAR-T Cell Team, preceduta da una riunione telematica sui casi clinici a cui possono partecipare anche i centri di secondo e terzo livello, ognuno dei quali porta in discussione eventuali pazienti che potrebbero beneficiare di un trattamento CAR-T. Questo consente di identificare precocemente i pazienti candidabili, evitando così potenziali ritardi nell'arruolamento dei pazienti.

Gene doping



WORLD
ANTI-DOPING
AGENCY

Repoxygen is a new way to artificially enhance an athlete's performance — one that is hard to detect and with potentially permanent effects

How it works

Repoxygen was developed as a gene therapy treatment for severe anemia. A patient is injected with a harmless virus carrying a modified gene that encodes erythropoietin, a protein that boosts red blood cell production. The host's cells can translate that gene into active proteins as if the foreign gene were the cells' own.

1 Delivery

DNA packaged in a virus is injected into the athlete and flows through the bloodstream into muscle.

Danger: Altered viruses can trigger dangerous reactions from the immune system.

Alternatives: Viruses are not the only way to deliver performance-enhancing genes to cells. Fat molecules or naked DNA can be injected directly into muscle.

2 Change

Viruses bind to muscle cells and deposit the foreign gene inside, where it integrates into the cell's chromosomes. The gene stimulates the production of the protein erythropoietin (EPO).

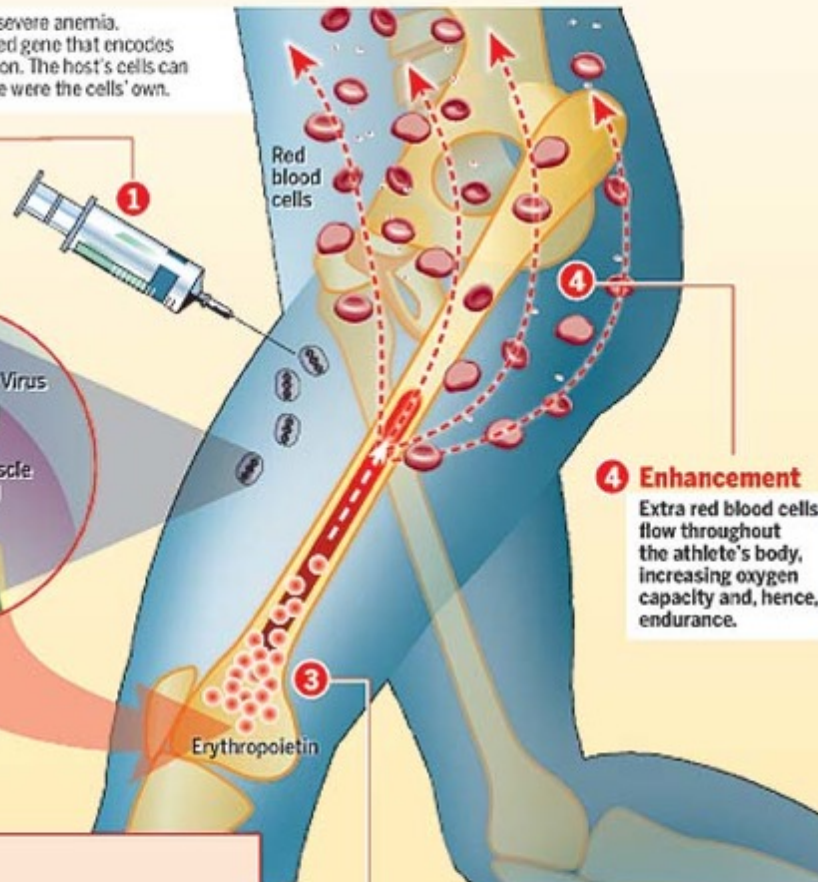
Danger: Inserting foreign DNA can damage the cell's own genes, risking cancer.

Detection: Presence of a foreign gene in the athlete's DNA.

Other gene doping possibilities

■ In 1988, H. Lee Sweeney and colleagues at the University of Pennsylvania School of Medicine injected mice with a virus carrying a gene that boosted production of insulin-growth factor 1 (IGF-1). The injected mice had 15% more muscle mass than untreated mice.

■ In 2004, Ronald Evans and colleagues at California's Salk Institute for Biological Studies engineered mice to have extra copies of the gene encoding a protein called peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPAR-delta). These mice could run twice as far as unaltered mice.



3 Dispersal

Erythropoietin (EPO), produced by the altered muscle cells, flows through the bloodstream to bone marrow, stimulating production of red blood cells, the body's main transporter of oxygen.

Detection: Changes in the concentration of multiple proteins in the blood or urine.

4 Enhancement

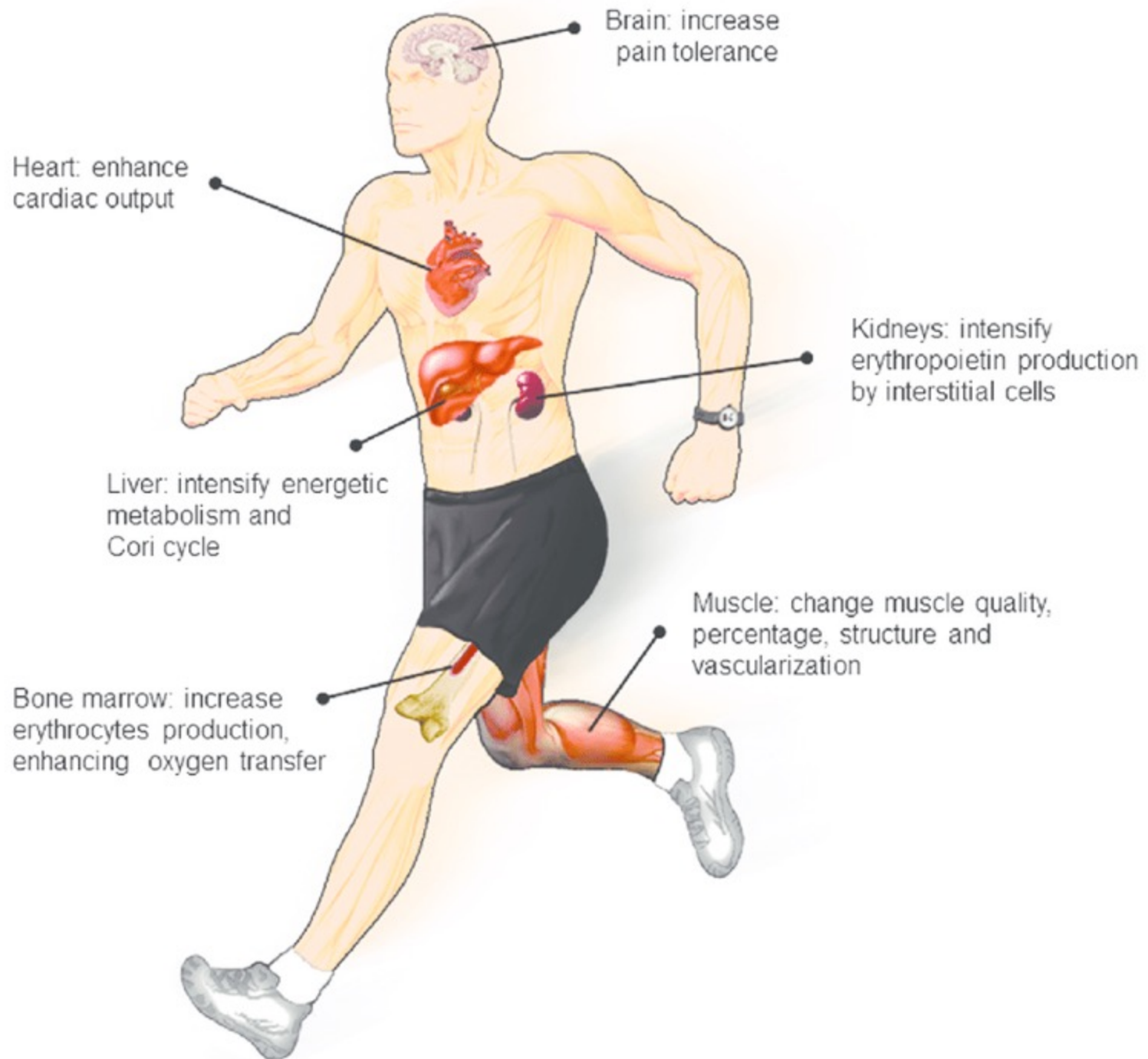
Extra red blood cells flow throughout the athlete's body, increasing oxygen capacity and, hence, endurance.

Geni:

-EPO

-IGF1

-Inibitori della
Miostatina



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 sbaglia bersaglio e vada a colpire una parte indesiderata del DNA (*red*)



Clustered Regularly Interspaced
Short Palindromic Repeats

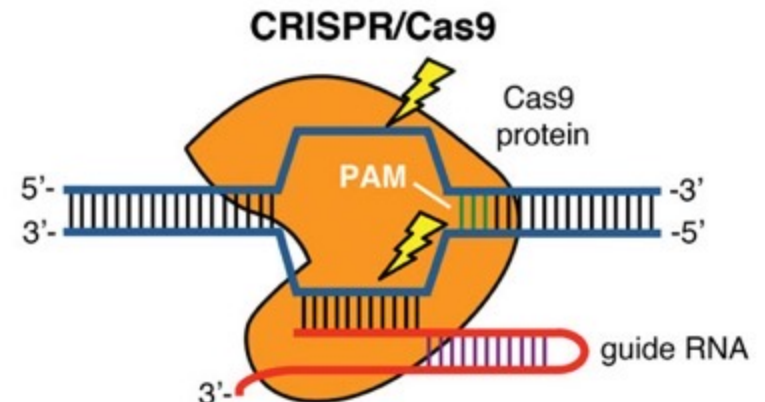
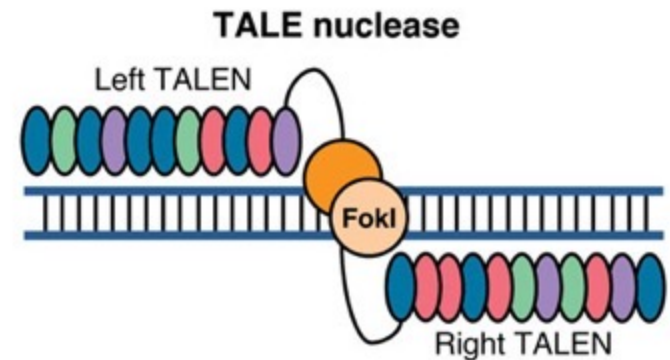
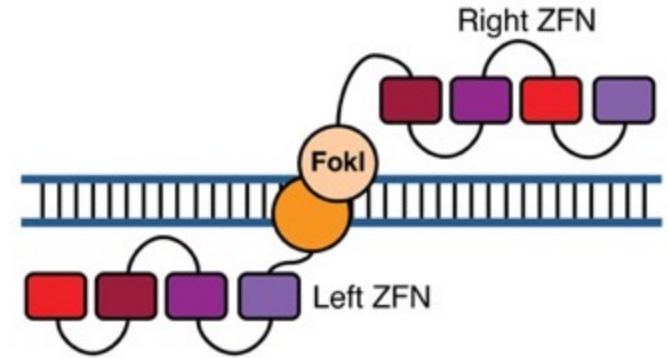
Tecnologie di “gene editing»

Zinc finger-TALEN-Crispr-Cas9

Cosa c'era prima di CRISPR/Cas9?

Prima di CRISPR/Cas9 (o A.C., Avanti CRISPR) esistevano altri sistemi di *editing* genetico mirato. Tra i più efficienti vale la pena ricordare le **nucleasi a dita di zinco** (o ZFN) e le **TALEN**, due sistemi di *editing* genetico tuttora in uso e già in clinica.

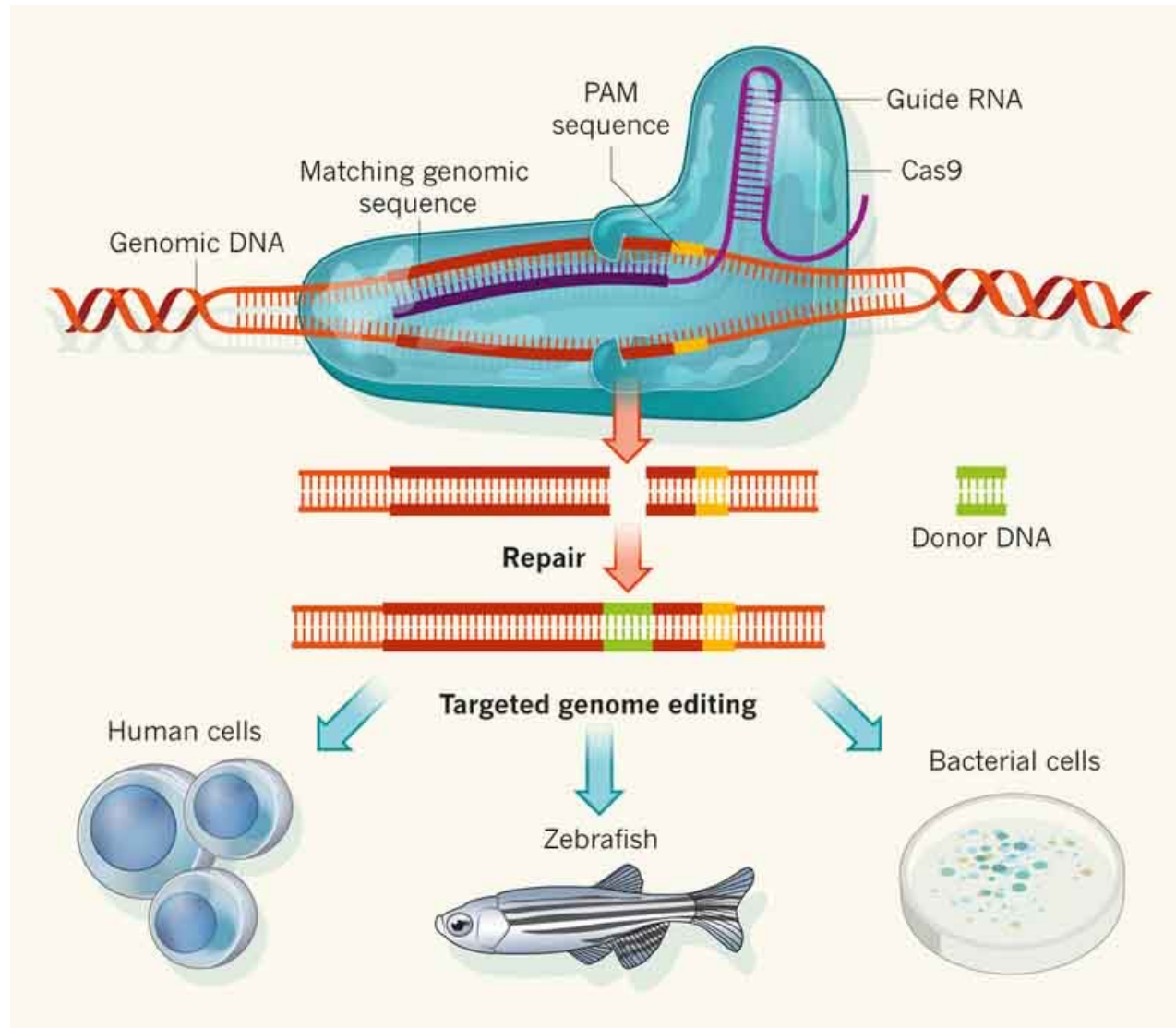
A differenza di CRISPR/Cas9, le ZFN e le TALEN sono **più complesse** da programmare, e quindi meno diffuse. Tuttavia, il loro uso è largamente sovrapponibile a quello di CRISPR/Cas9. La decennale esperienza di ricerca e in ambito clinico acquisita con le ZFN e le TALEN ha permesso un rapido sviluppo di CRISPR/Cas9.



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

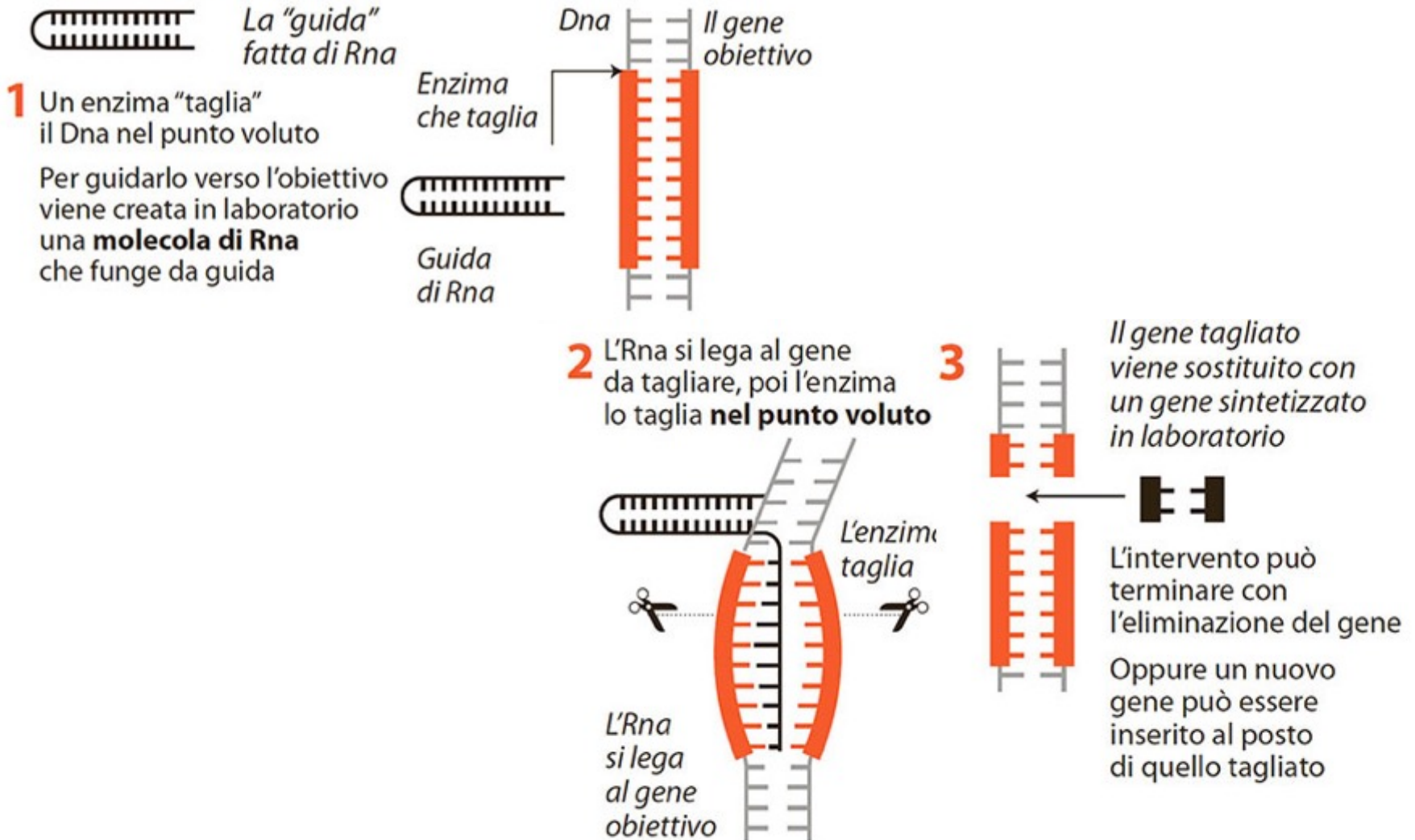
CRISPER/CAS9: il primo sistema preciso di “gene editing”



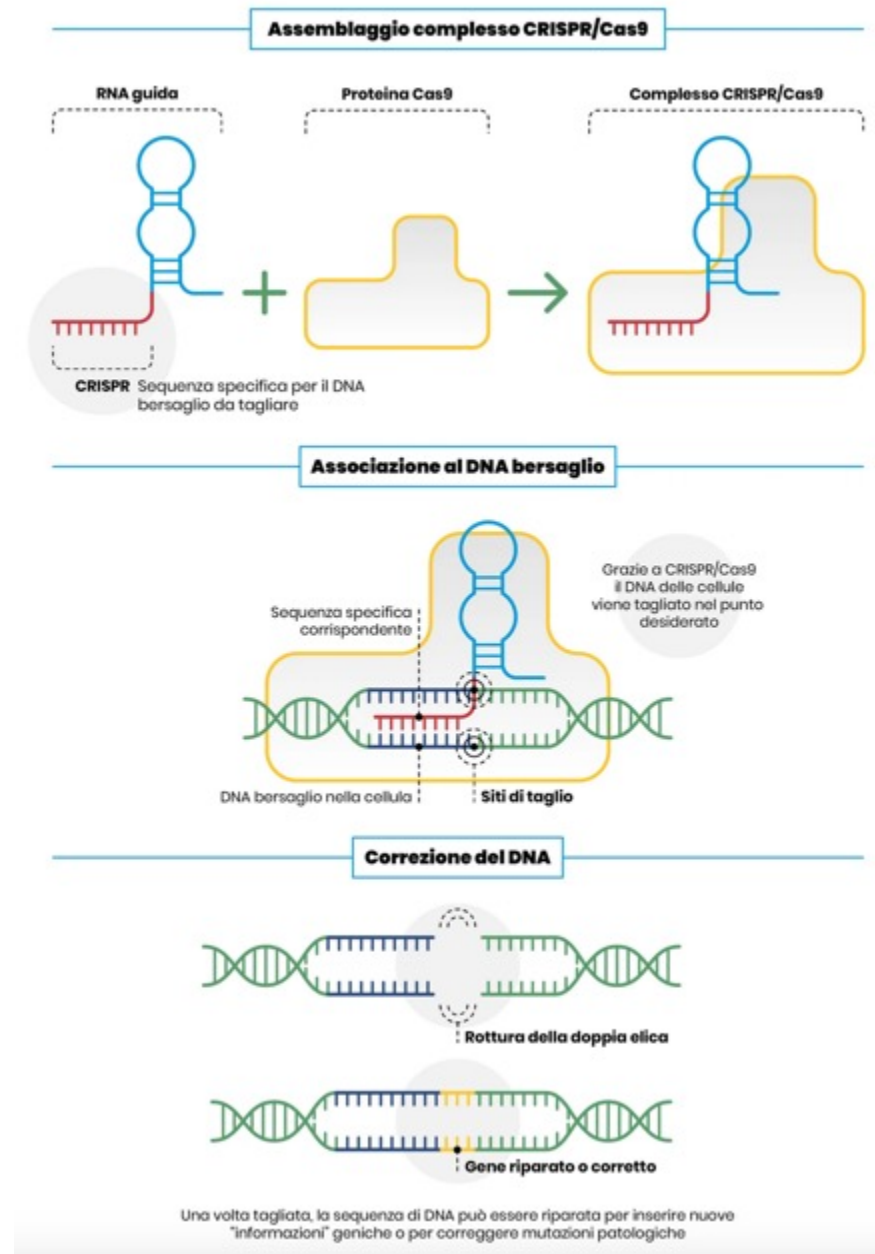
CRISPR/CAS9: il primo sistema preciso di “gene editing”

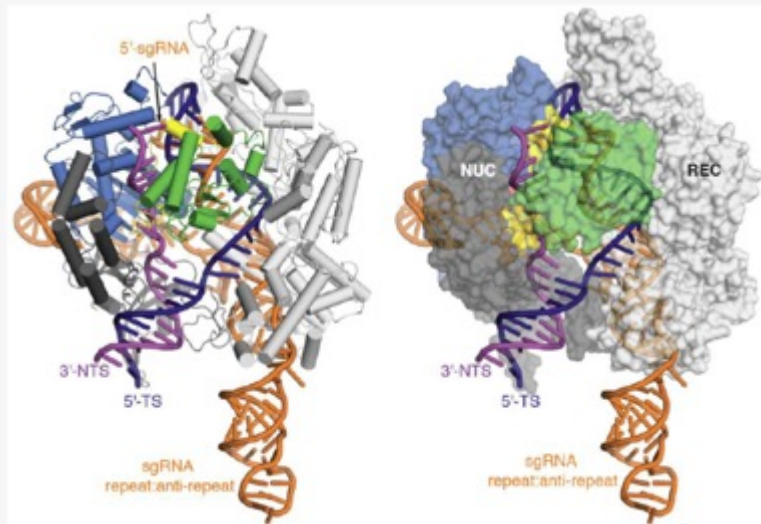
Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

La tecnica



CRISPR è implicata nel **riconoscimento delle sequenze da tagliare**. Questo riconoscimento è assolutamente **specifico** e avviene grazie a un'apposita molecola di RNA, detta **"RNA guida"** (la cui sequenza è complementare a quella del sito che si vuole tagliare sul DNA), che può essere facilmente modificata in laboratorio. Come dice il nome stesso, l'RNA guida "orienta" Cas9, l'altra componente del complesso, indicandole dove effettuare il taglio. **Cas** (seguita da un numero, di solito **9**) è una **nucleasi**, ossia un enzima che taglia il DNA, ed è infatti responsabile del **taglio** della molecola bersaglio. Una volta associata a Cas9, l'RNA guida agisce come una specie di "ancora", fermando Cas9 sulla sequenza di DNA scelta. **Cas9**, il cui nome sta per CRISPR-*associated**, **introduce una rottura della doppia elica** nel sito prescelto, e può essere programmata per effettuare specifiche modifiche al genoma di una cellula. Una volta tagliato, il DNA può essere aggiustato dai naturali meccanismi di riparazione della cellula; in alternativa, attraverso opportuni accorgimenti, è possibile **eliminare** sequenze di DNA dannose dal genoma bersaglio oppure **sostituire** delle sequenze, andando ad esempio a correggere delle mutazioni causa di malattie

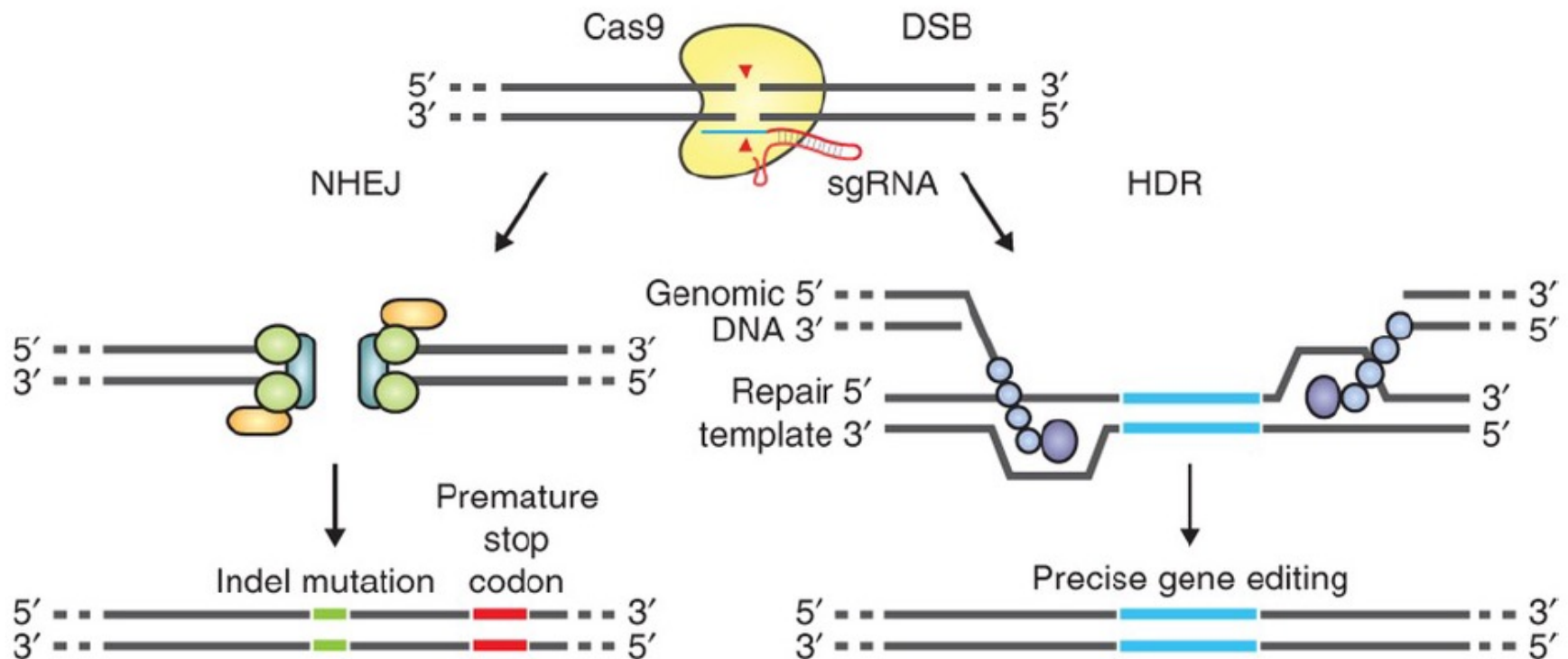




Cas9 bound to target DNA. Crystal structure of Cas9-guide RNA complex primed for DNA cleavage. [Read more...](#)

Type II CRISPR–Cas systems use an RNA-guided DNA endonuclease, Cas9, to generate double-strand breaks in invasive DNA during an adaptive bacterial immune response. Cas9-mediated cleavage is strictly dependent on the presence of a protospacer adjacent motif (PAM) in the target DNA. The ability to program Cas9 for DNA cleavage at specific sites defined by guide RNAs has led to its adoption as a versatile platform for genome engineering and gene regulation. To understand the how Cas9 uses its guide RNA for interrogation of target DNA sequences, we have solved molecular structures of Cas9 in the apo, guide RNA-bound, and target DNA-bound states. Crystal structures of Cas9 bound to single-guide RNA reveal a conformation distinct from both the apo and DNA-bound states, in which the 10-nucleotide RNA “seed” sequence required for initial DNA interrogation is preordered in an A-form conformation. This segment of the guide RNA is essential for Cas9 to form a DNA recognition-competent structure that is poised to engage double-stranded DNA target sequences. We construe this as convergent evolution of a “seed” mechanism reminiscent of that used by Argonaute proteins during RNA interference in eukaryotes.

How can cells repair double strand breaks?



Using the **Cas9** endonuclease is possible to induce precise DSBs and this greatly **stimulate genome editing through HR-mediated recombination** events

Despite this, **HDR is a very inefficient mechanism**. The percentage of homologous recombination can be lower in resting cells, as in cardiomyocytes

Batteri e strategie di difesa

In natura sono sempre esistiti prede e predatori. Nel mondo microscopico dei batteri, i predatori, o meglio gli invasori, sono rappresentati dai **batteriofagi**: sono virus che attaccano i batteri, nei quali iniettano il proprio materiale genetico per iniziare la replicazione.

Per difendersi da questo attacco indesiderato, i batteri hanno sviluppato un sistema ingegnoso: delle **"forbici" molecolari estremamente precise** che **tagliano** il DNA dell'invasore e lo inattivano, **impedendo così l'infezione**.

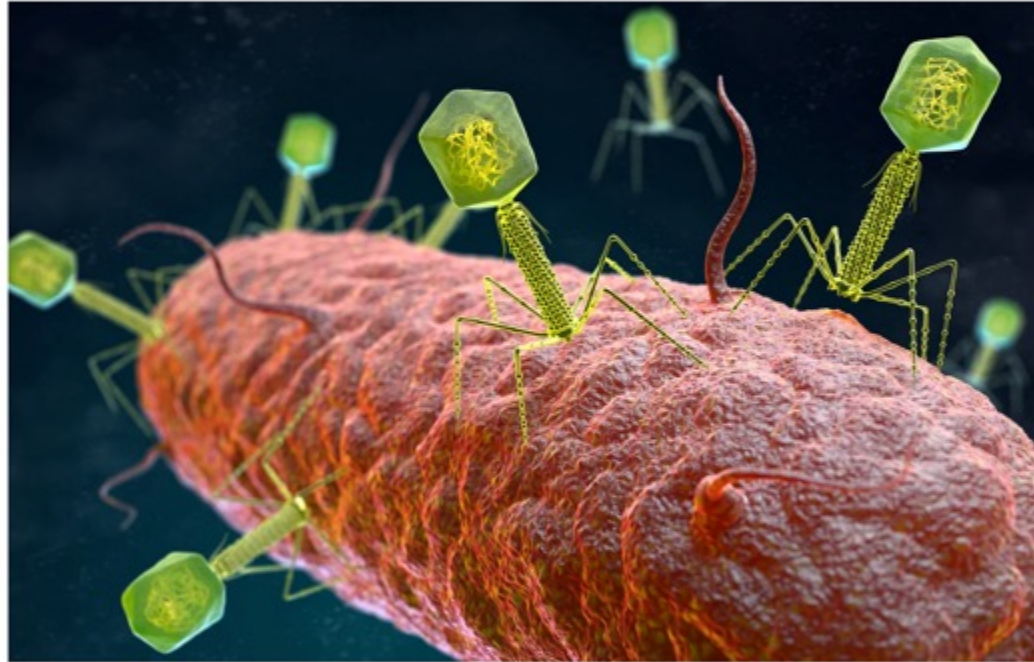


Illustrazione che mostra l'infezione di un batterio da parte di alcuni batteriofagi. I batteriofagi (in verde) si "aggrappano" alla membrana del batterio (in arancione) e iniettano al suo interno il proprio acido nucleico. Per difendersi, il batterio ha sviluppato il sistema CRISPR/Cas9, che taglia l'acido nucleico del batteriofago in punti specifici.

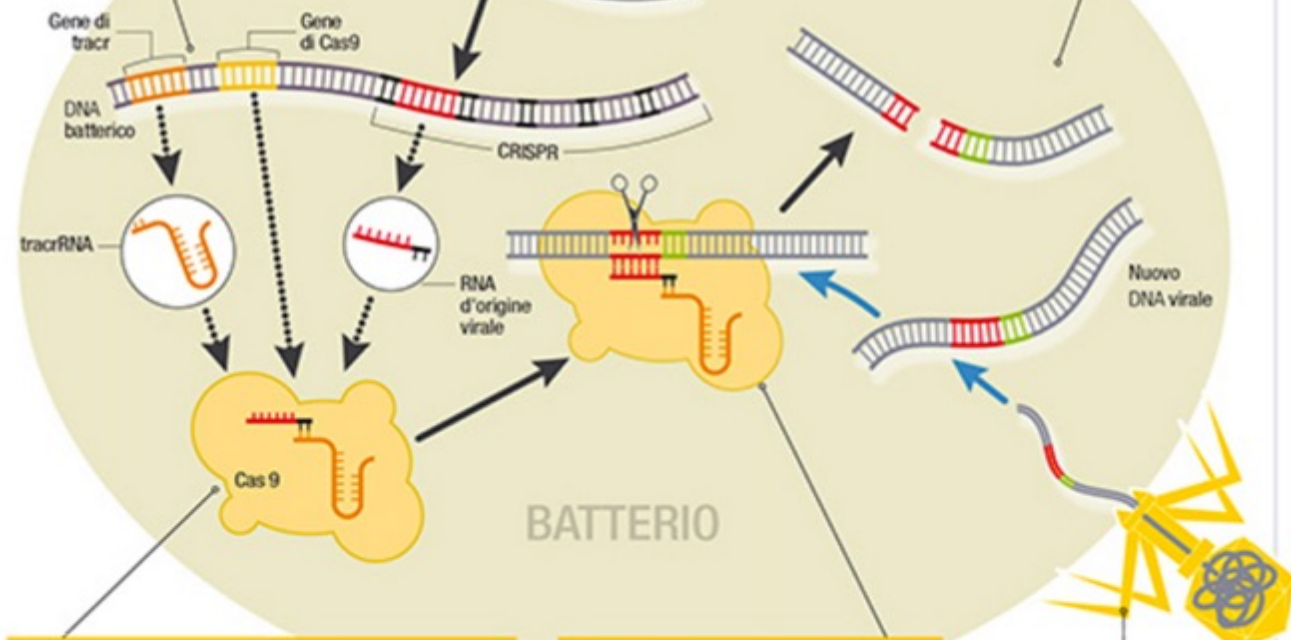
Ancora più sorprendente è il fatto che, mediante il sistema CRISPR/Cas9, i batteri siano in grado di **memorizzare geneticamente le infezioni già avvenute**, permettendo quindi al batterio di rispondere prontamente ad un eventuale secondo incontro con il patogeno e di tramandare questa risposta alla loro progenie.

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).

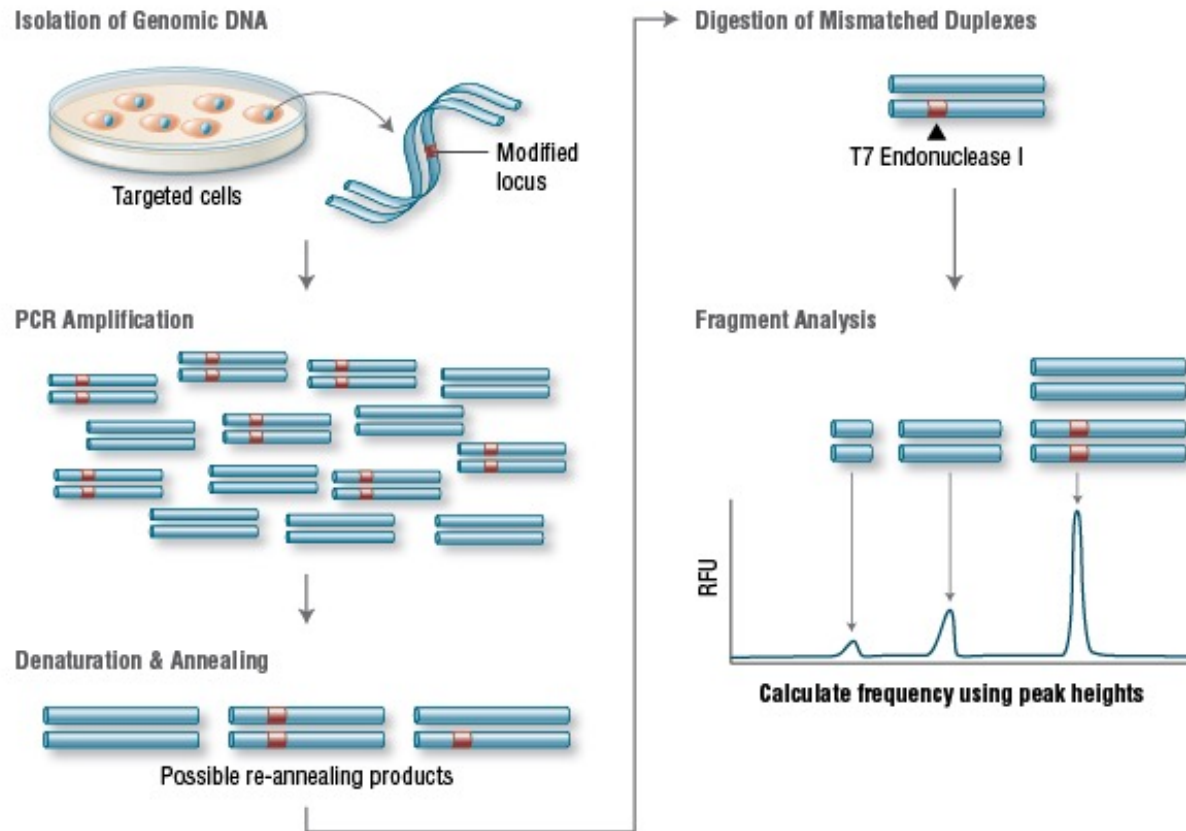
3 Nuova infezione

Un virus già incontrato inietta il suo DNA nel batterio.

IN PRATICA????

Come possiamo creare le guide e vedere se funzionano???

- Si disegnano le guide (prediction bioinformatica)
- Si ordinano gli oligos
- Si clonano in un plasmide con il promotore adeguato e sequenze spacer
- Si trasfettano/trasducono insieme a Cas9 nelle cellule bersaglio
- Si guarda se la proteina di interesse è rimossa/ riparata in caso di template substrato



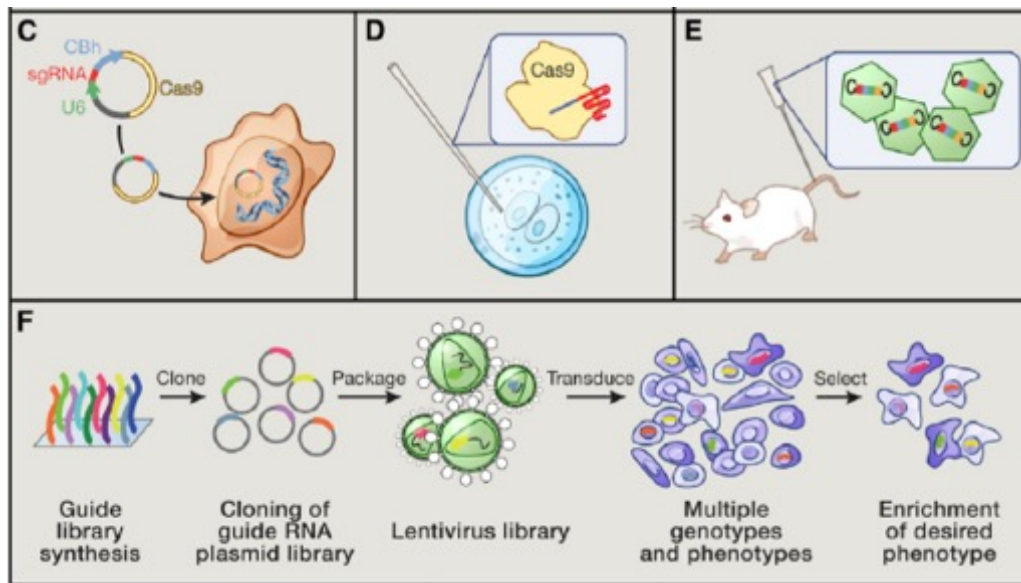
CRISPR/Cas9 system possible application

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

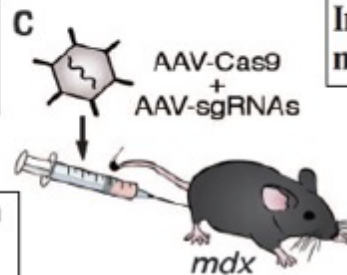


Systemic delivery of CRISPR-Cas9 restores dystrophin expression in mouse

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

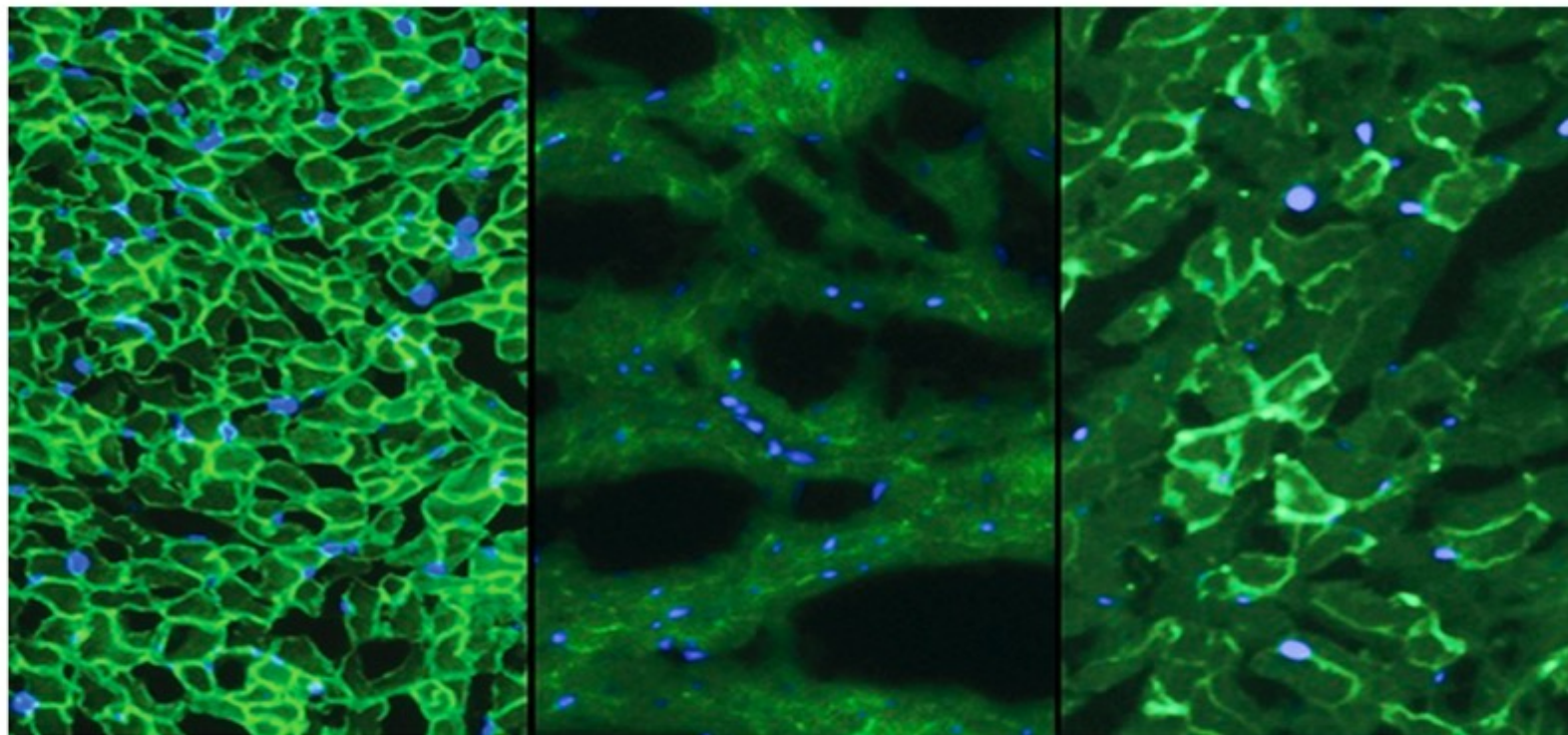
In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells

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†}



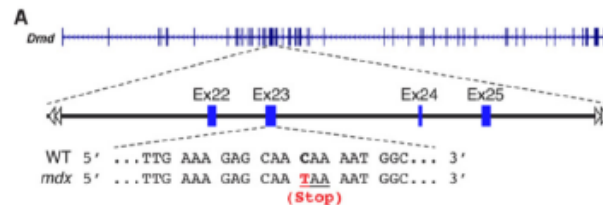
Duchenne Muscular Dystrophy (DMD)

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.



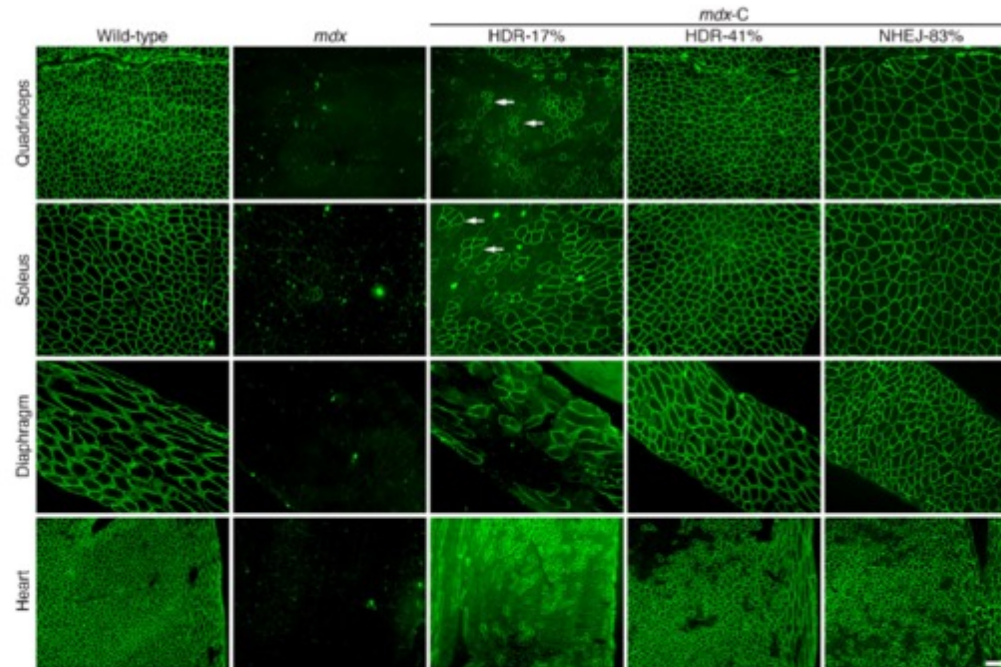
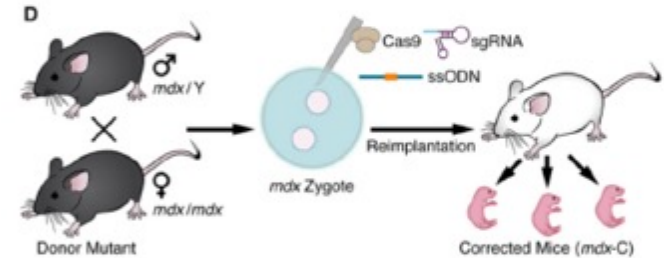
CRISPR/Cas9 system to correct the mutation

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†}

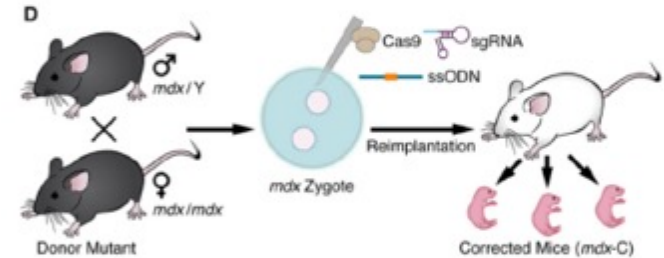


Dystrophin immunofluorescence (green) in wild-type mice is present in all muscles and is completely absent in *mdx* mice. In the HDR-41% and in the NHEJ-83% *mdx*-C mice muscles are composed by dystrophin-positive myofibers only.

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†}

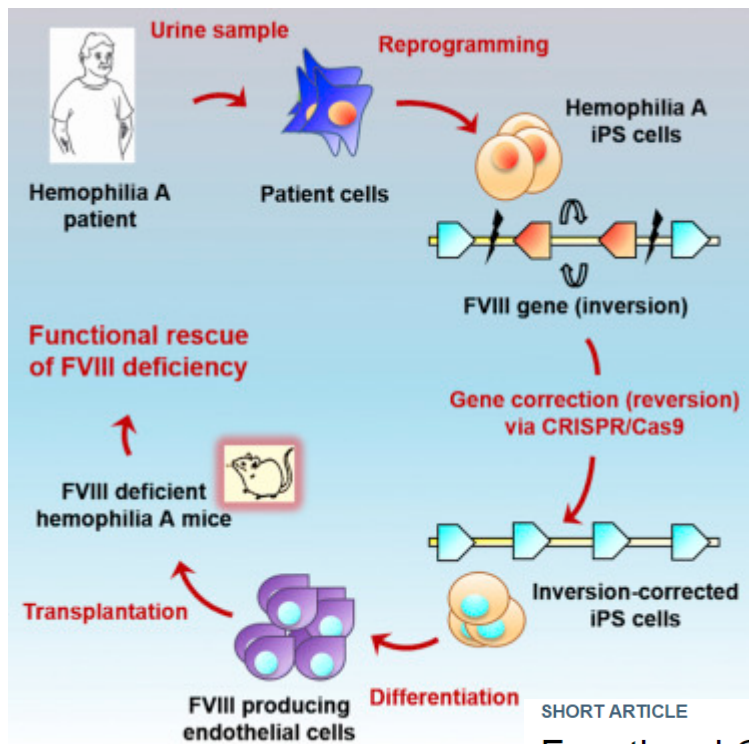


Long *et al.* apply genome editing to “correct” the disease-causing mutation in mice genetically destined to develop the disease. This germline editing strategy kept muscles from degenerating, even in mice harboring only a small percentage of corrected cells. Although not feasible for humans, this proof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

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  

Curare l'emofilia?

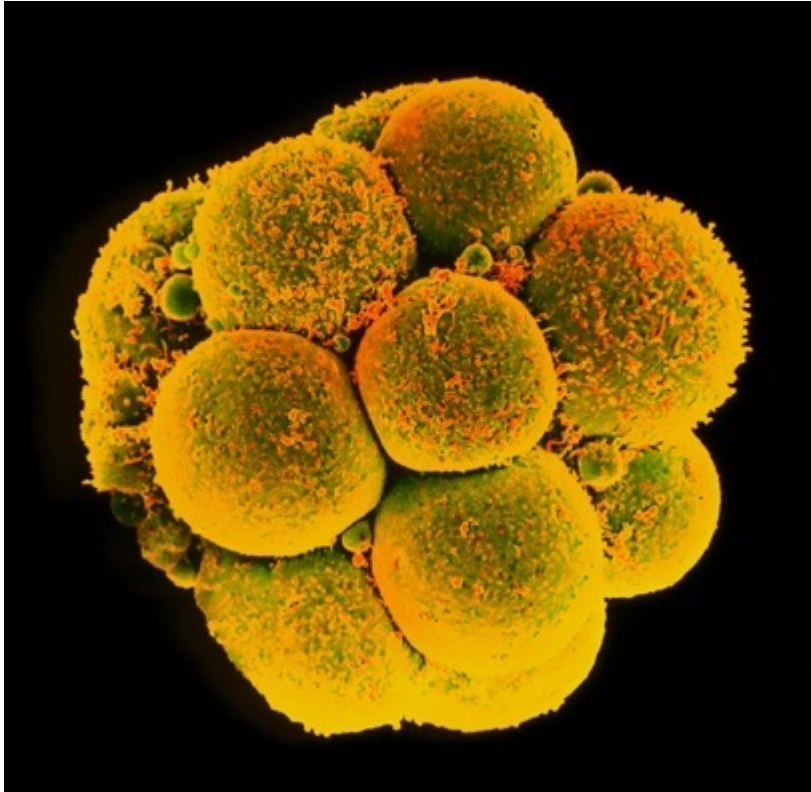
The X-linked genetic bleeding disorder caused by deficiency of coagulator factor IX, hemophilia B, is a disease ideally suited for gene therapy with genome editing technology.

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.

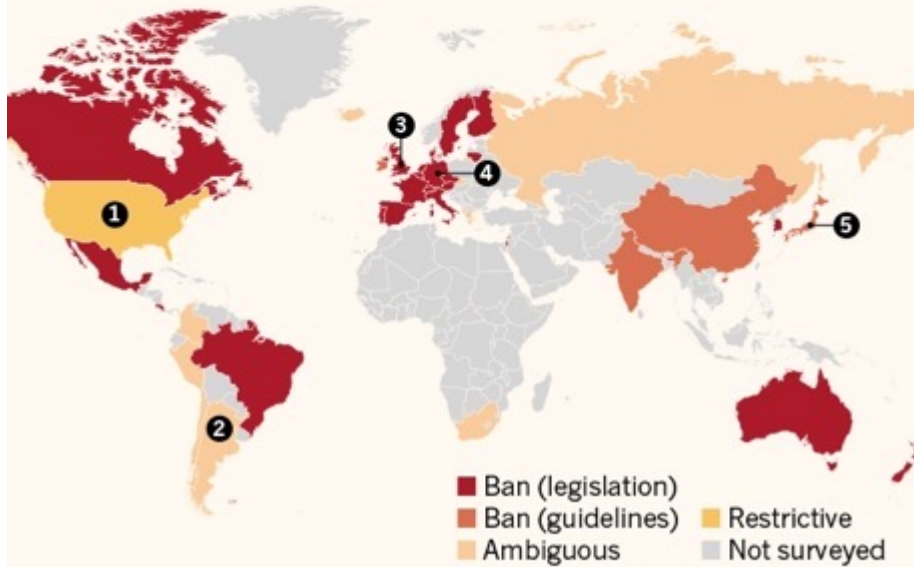
[Ewen Callaway](#)

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.