

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

Perché?

- 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)

Genetically modified animals



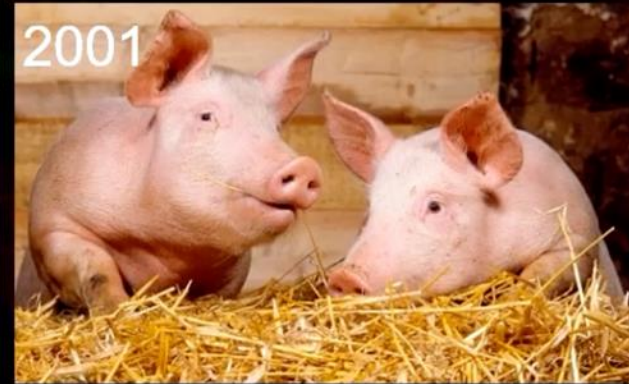
1981



1994



2003



2001



1989



2015



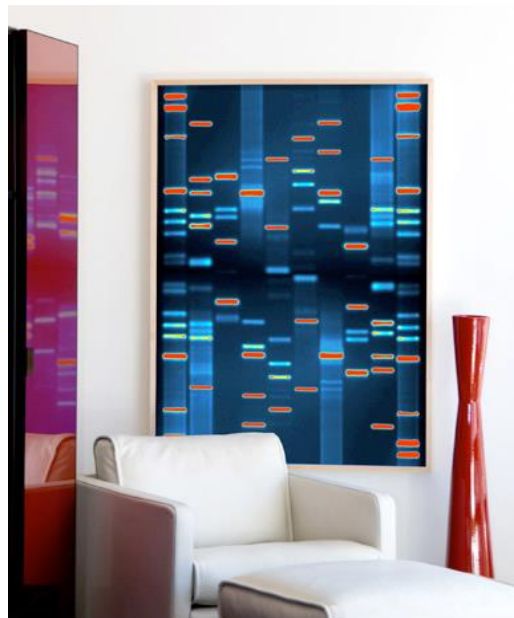
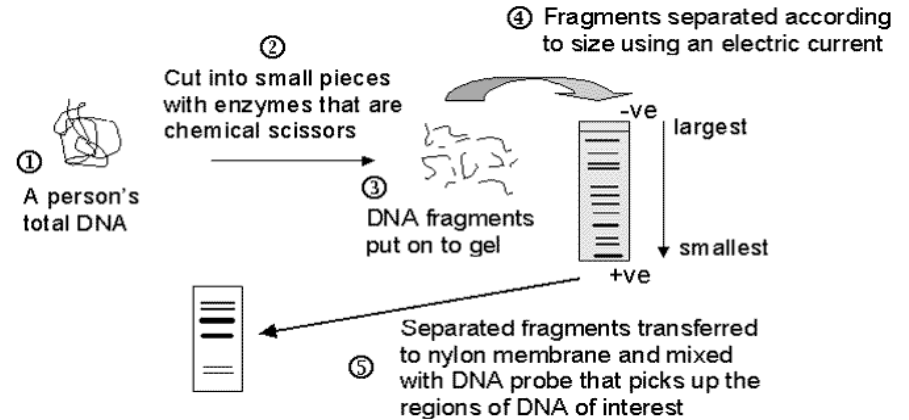
2009



1987

Ritratto del proprio DNA

DNA genomico estratto dalle cellule
della mucosa della bocca
Digestione del DNA
Corsa elettroforetica
Si ottiene una combinazione di bande
unica per ogni individuo



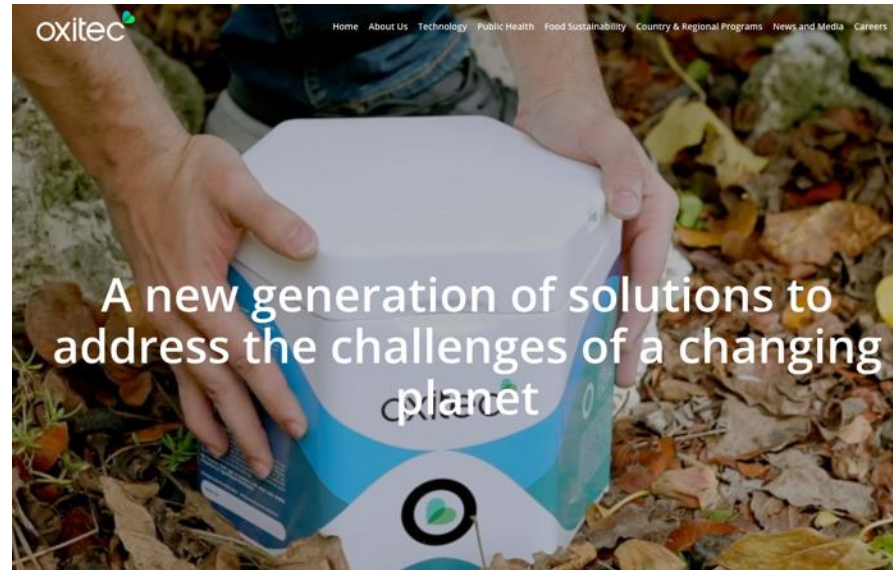


SCIENCE & NATURE

Can Mosquitoes Fight Malaria?

Scientists can build a mosquito that resists infection, but getting the insects to pass along the gene is a harder task

By Eric Jaffe



Our Insects

Oxitec's safe and non-biting Friendly™ male mosquitoes are designed to suppress local wild populations of biting, disease-spreading mosquitoes. Find out how Our Technology works.

Click on each insect for its factsheet.

			
<i>Aedes aegypti</i>	<i>Aedes albopictus</i>	<i>Anopheles albimanus</i>	<i>Anopheles stephensi</i>

Genetic elimination of dengue vector mosquitoes

Megan R. Wise de Valdez^{a,1}, Derric Nimmo^b, John Betz^a, Hong-Fei Gong^b, Anthony A. James^{c,2}, Luke Alphey^{b,d,2}, and William C. Black IV^a

^aDepartment of Microbiology, Immunology, and Pathology, Colorado State University, Fort Collins, CO 80523-1682; ^bOxitec Ltd., 71 Milton Park, Abingdon, Oxfordshire, OX14 4RX, United Kingdom; ^cDepartment of Microbiology and Molecular Genetics and Department of Molecular Biology and Biochemistry, University of California, Irvine, CA 92697-3900; and ^dDepartment of Zoology, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3PS, United Kingdom

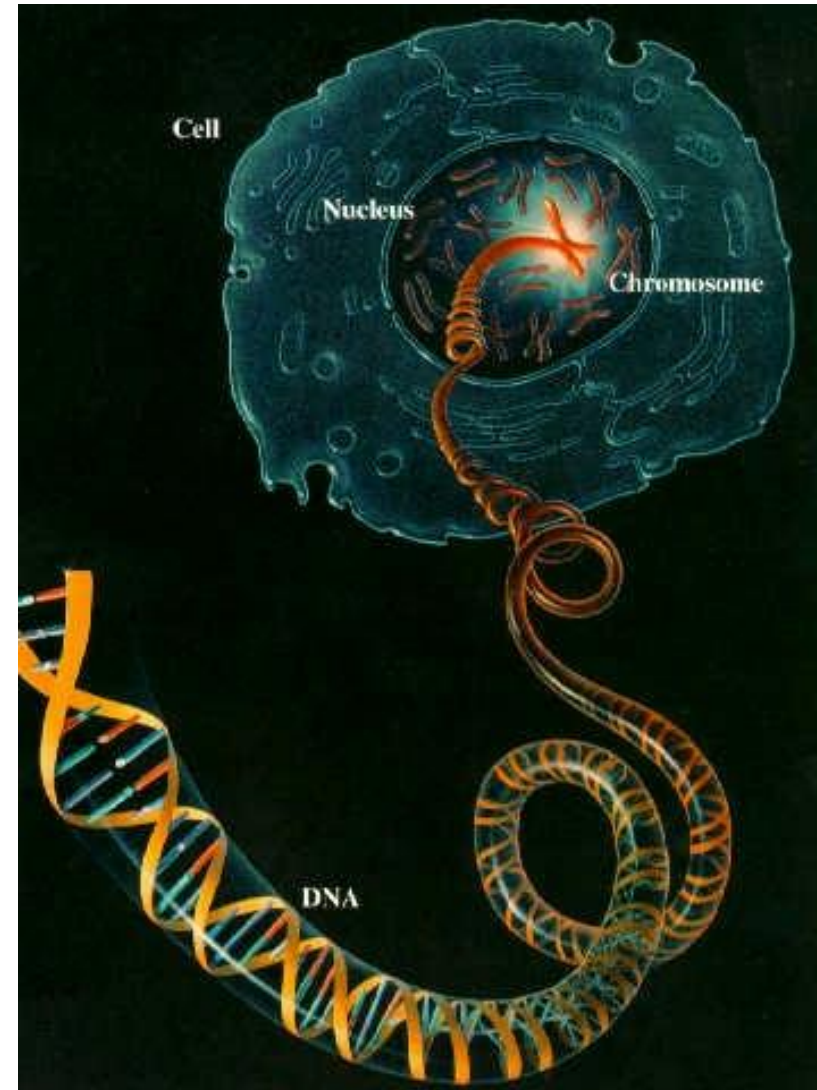
Contributed by Anthony A. James. January 10, 2011 (sent for review September 29, 2010)



Oxitec released 3.3 million sterile male transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes in a field trial aimed at reducing wild mosquito populations to control dengue.

TERAPIA GENICA

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



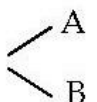
Terapia genica somatica: quali i migliori candidati?

- ❑ **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 alla

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

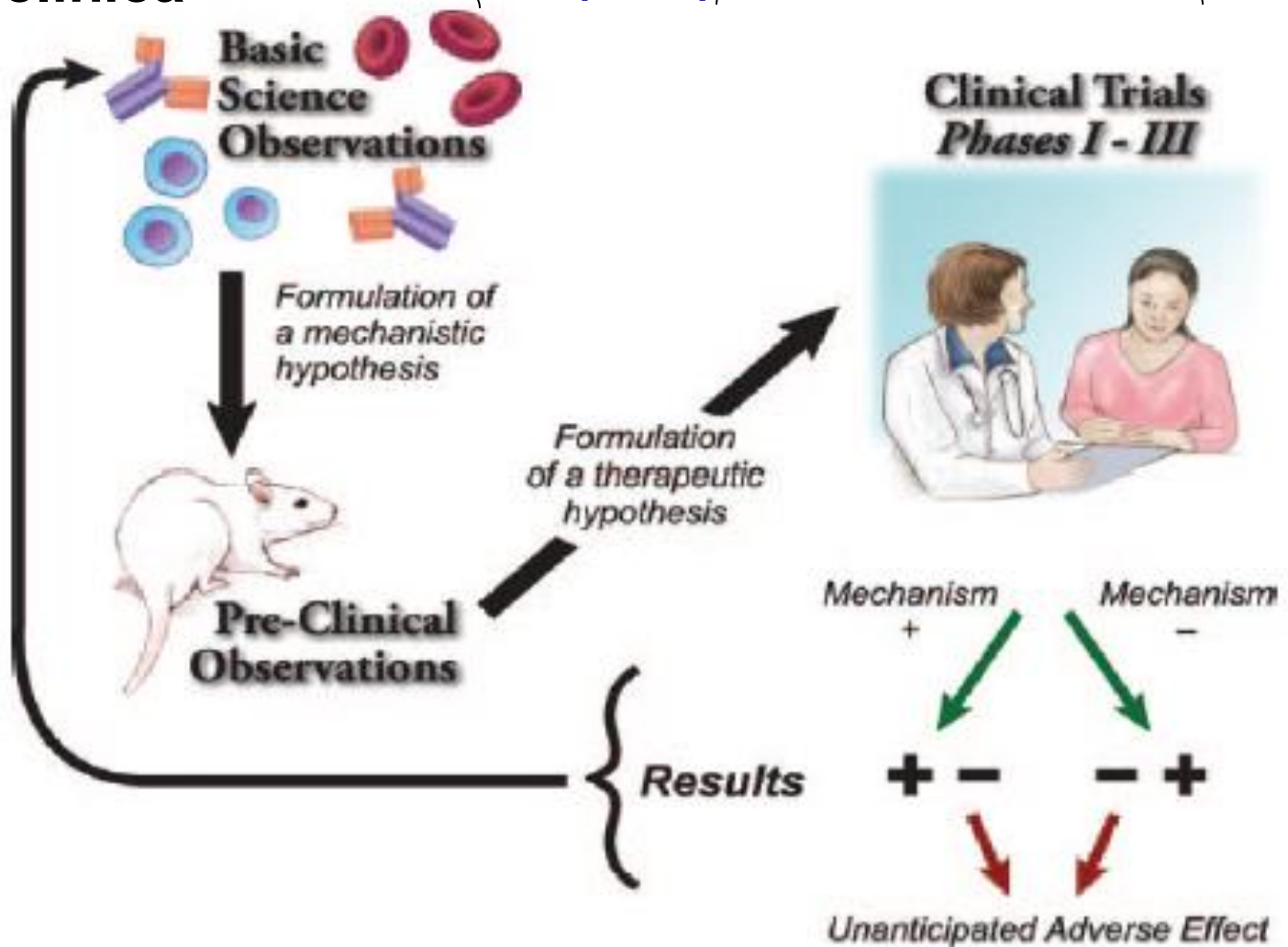
Some Acquired Diseases that are Candidates for Gene Therapy

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	

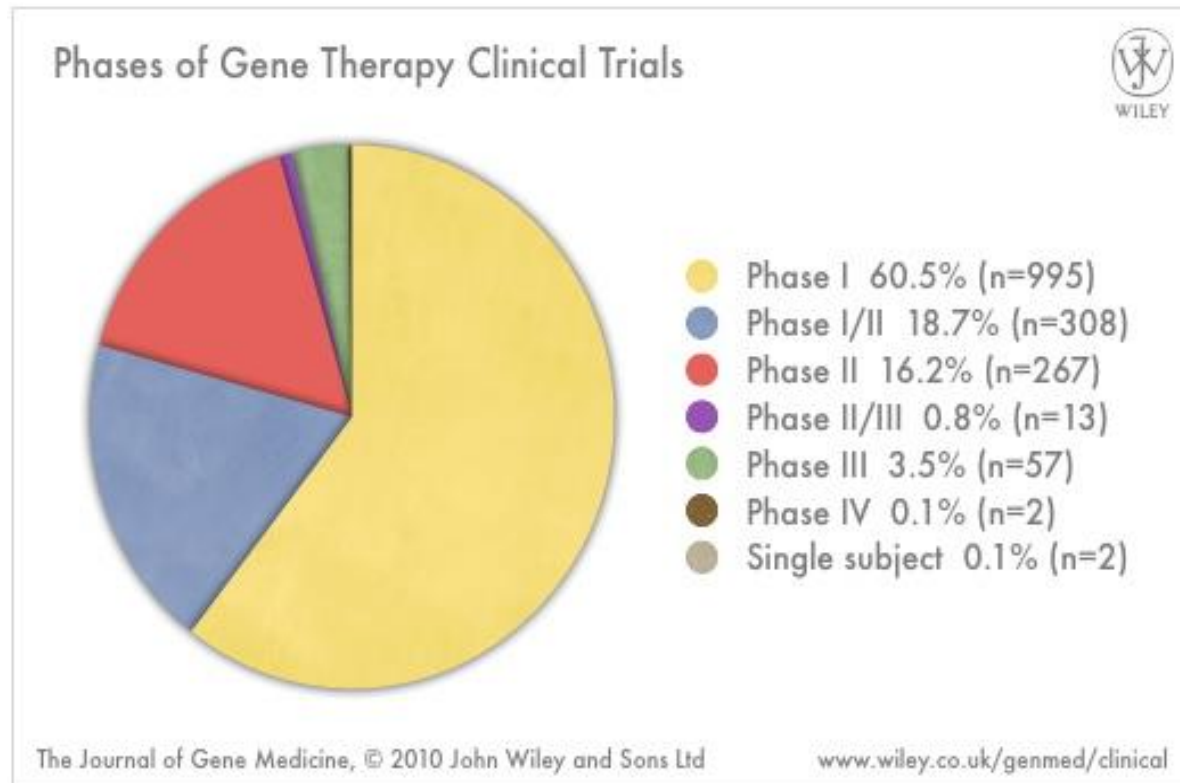
Sviluppo di una nuova terapia

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

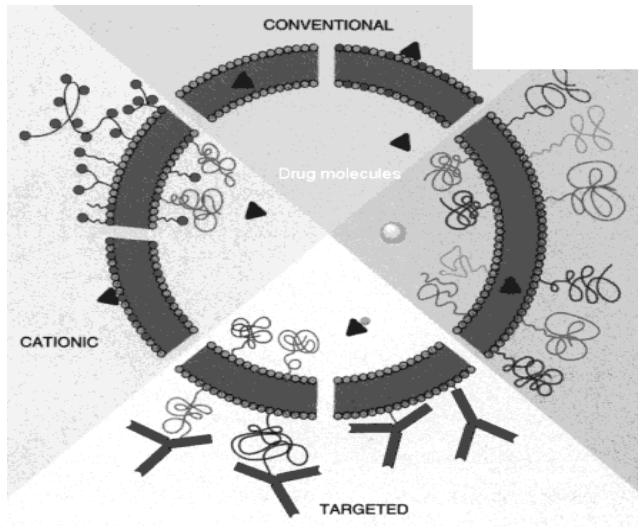
Tecniche di trasferimento genico

Lipofezione

Liposomi

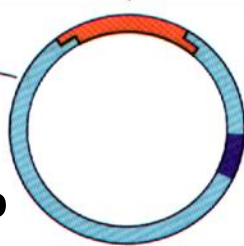
Lipidi cationici

Complessi liposomi/proteine



Recombinant
DNA molecule

DNA nudo



Vettori virali

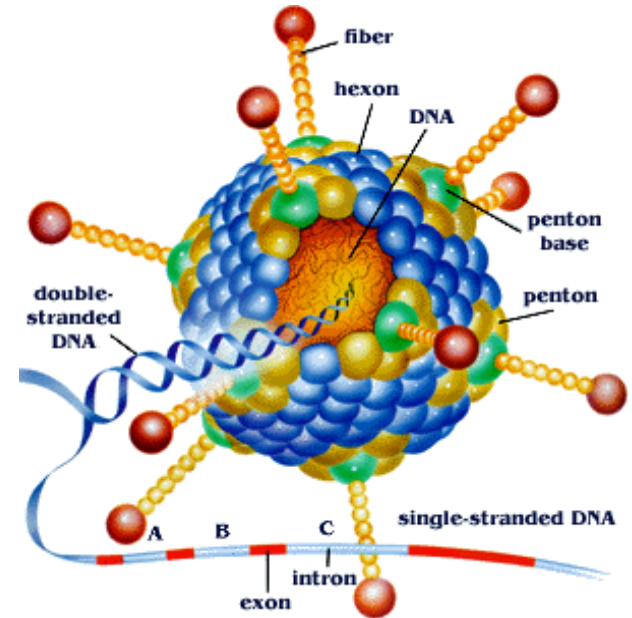
Retrovirus

Adenoviruses

Virus adeno-
associati (AAV)

Lentiviruses

Herpesviruses



Metodi fisici

Microiniezione

Elettroporazione

DNA complessato a nanoparticelle

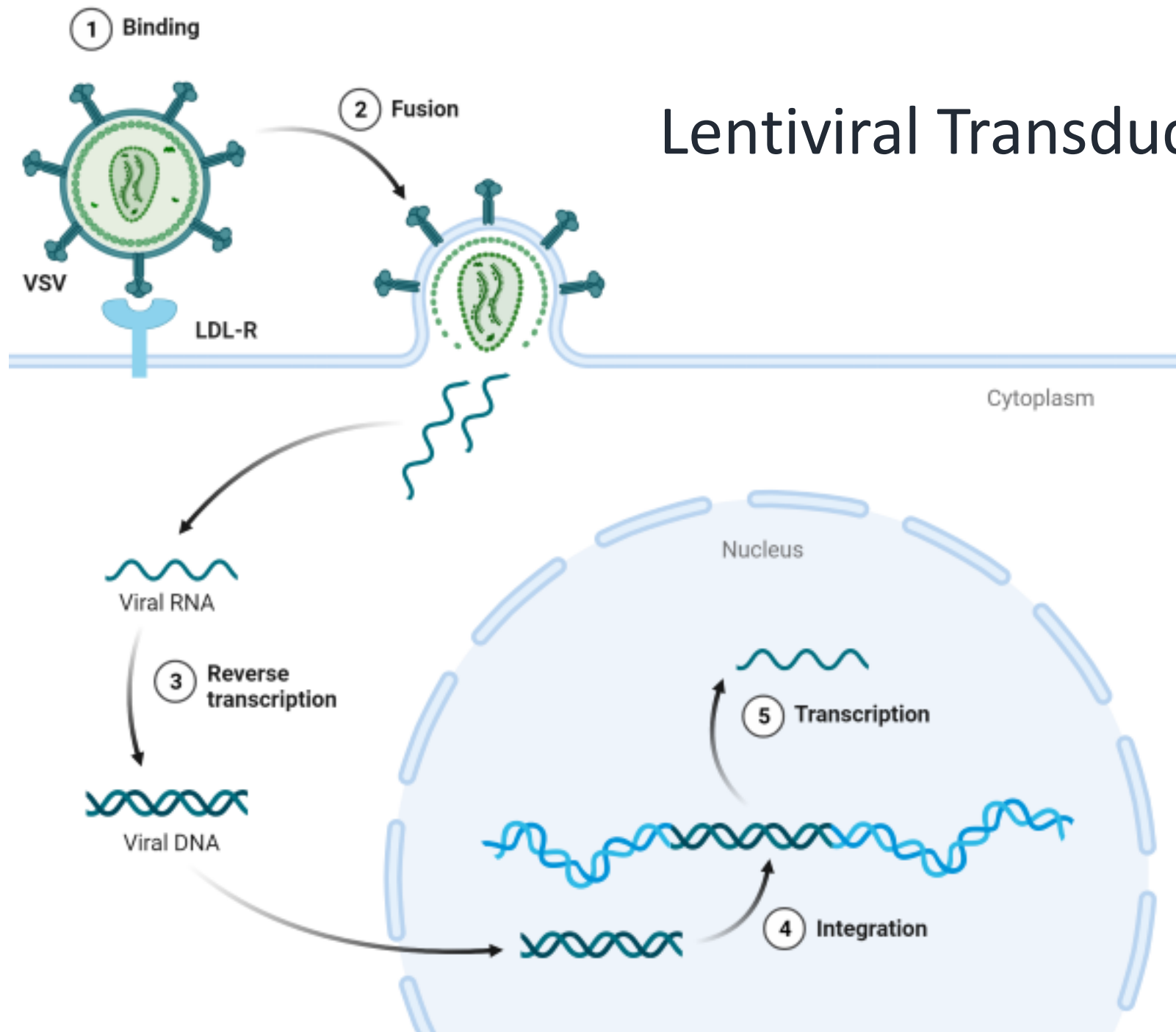
Gene gun ("spara" nella cellula
particelle microscopiche
d'oro o tungsteno ricoperte
da DNA).



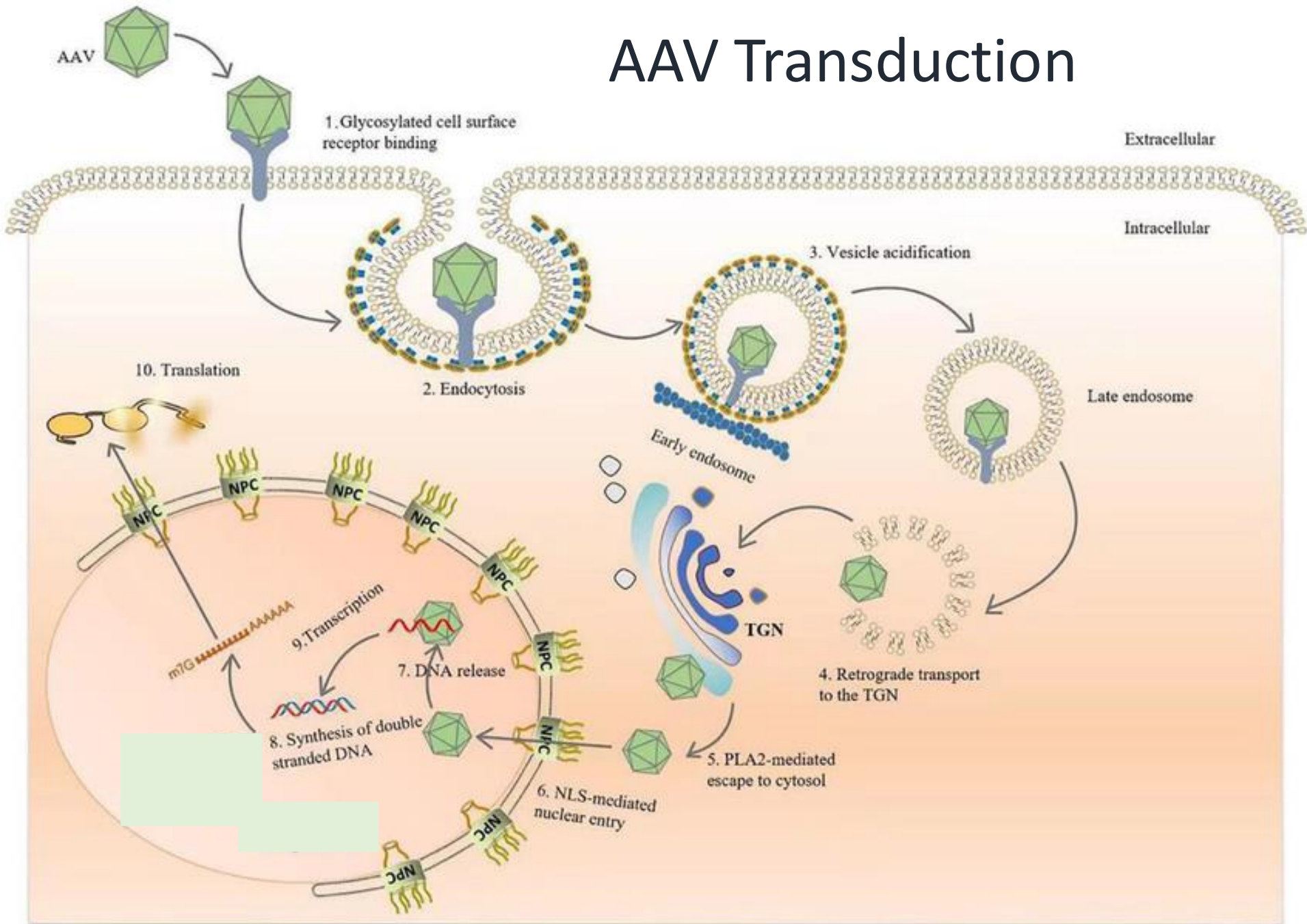
Vettore Virale ideale

- ✓ 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

Lentiviral Transduction

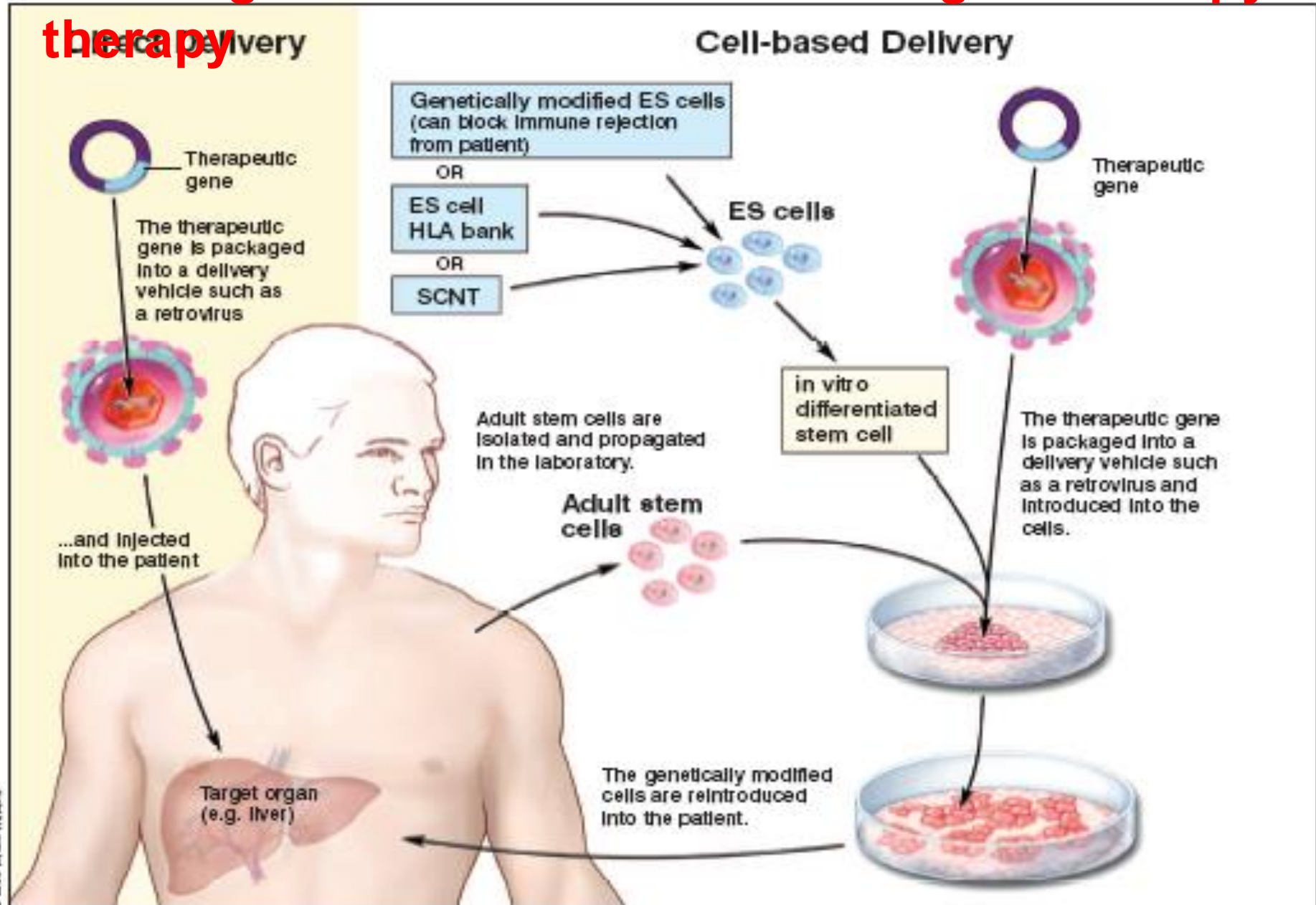


AAV Transduction



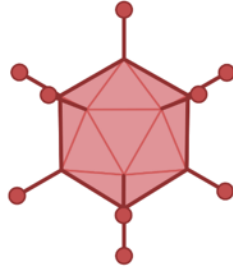
In vivo gene therapy

Ex vivo gene therapy

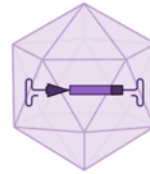


Gene Vectors in Therapy

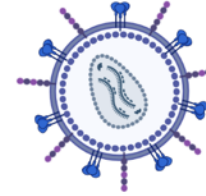
Adenovirus



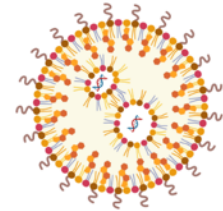
**Adeno
Associated Virus**



**Lentivirus &
Retrovirus**



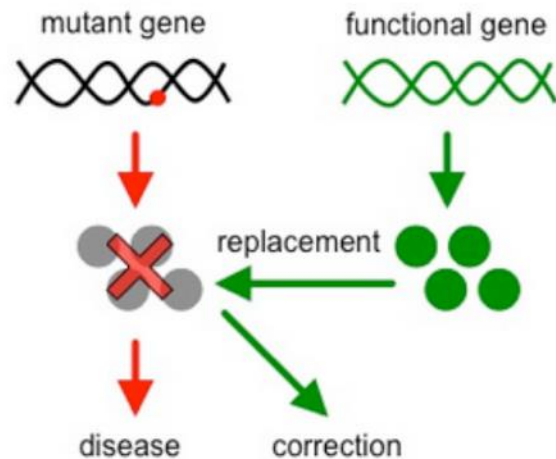
Nanoparticles



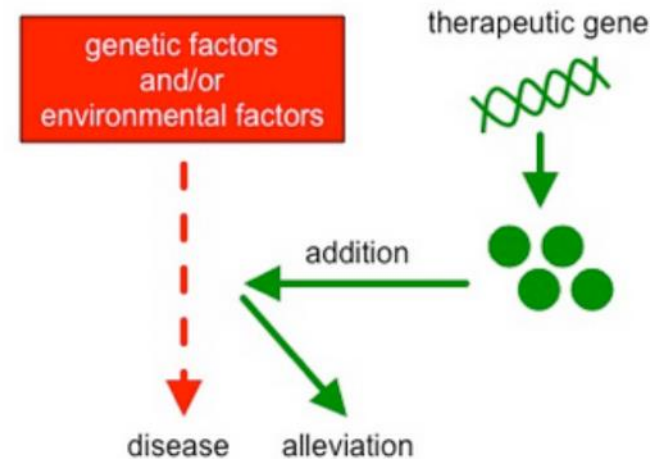
	Adenovirus	Adeno Associated Virus	Lentivirus & Retrovirus	Nanoparticles
1 Expression & Genomic integration	High level Long-term expression Transient expression No genomic integration	Moderate level Long-term expression Transient expression No genomic integration	High level Long-term expression Stable gene expression Genomic integration	High level Short-term expression Transient expression No genomic integration
2 Transduction & Packaging capacity	Dividing and non-dividing cells 4-5 kb	Dividing and non-dividing cells 5kb	Dividing cells (Retrovirus) Dividing and non-dividing cells (Lentivirus) 8kb	Dividing and non-dividing cells > 10 kb
3 Immunogenicity	High Immunogenicity	Moderate Immunogenicity	Moderate Immunogenicity	Low Immunogenicity
Clinical trial	Yes	Yes	No	Yes

Four Gene Therapy Strategies

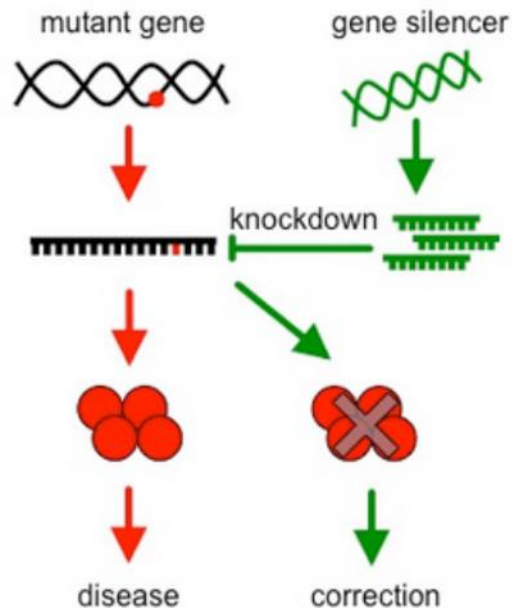
A. Gene replacement



B. Gene addition



C. Gene knockdown



D. Gene editing

