

### Vettori

#### Murini e Aviari

Si possono eliminare molti o tutti i geni. Studi con HSC su topi e sorting magnetico. Usati per le **SCID**, mettendo in HSC una copia del gene sano, e basta solo una copia in quanto è una malattia **X-linked**. (Gene ada o Gene della catena gamma).

#### Retrovirali

Hanno: 2 LTR (formate in retrotrascrizione); 3 geni (Gag, che codifica per il tRNA e PBS, Pol, che contiene trascrittasi inversa, proteasi e integrasi, Env, proteine dell'envelope). **Svantaggio** s'integrano solo in mitosi. Esistono anche con LTR non funzionante: sIN. Esempi: Virus di Molony e Virus di Rous. **Integrazione casuale**, ma spesso in siti di trascrizione MECOM.

#### Lentivirali

Hanno: LTR; Gag; Pol; Env; geni accessori (Rev e RREV); Segnale d'incapsidamento; tRNA; Trascrittasi Inversa; Proteina G del VSV; Promotore e gene terapeutico. **1° generazione** a bassa sicurezza. **2° Generazione** delezione geni non importanti. **3° generazione** LTR non funzionante, uso di promotore, 3 plasmidi di packaging. Integrazione abbastanza casuale: **Hotspots**.

### Vettori (cont)

#### AAV

ssDNA, 5Kbp. Polarità + o - incapsidamento al 50% con una polarità o l'altra. Hanno: 2 ITR; Rep e Cap. Non sono patogeni; **Alta molteplicità d'infezione** (Cocktail di geni); Integrazione sul **cromosoma 19**; uso anche su **cellule perenni**; **persistenti**, usati per fare **topi transgenici**; **tropismo selettivo** per cuore; muscolo e pancreas. Associati a metodi per la rottura del DNA (per evitare il legame con l'MNR complex)

### Terapia Genica per l'Occhio

È un organo molto adatto alle applicazioni di terapia genica. Perché:

- è *facilmente accessibile*
- presenta una struttura anatomica molto compartimentalizzata che *consente la somministrazione locale di vettori*, ed è un sito **immuno-privilegiato**. Questo perché, anche nel caso in cui il soggetto presentasse Ab anti-AAV, nell'occhio i vettori non sarebbero non sarebbero eliminati.
- esistono molti modelli animali facilmente reperibili (Cane mutato RPE65).
- Il vettore AAV, somministrato in via **intra-vitreal** (nel bulbo ottico) è capace di trasdurre le cellule ganglionari della retina che poi arrivano al cervello.
- Invece è possibile inserire nello spazio **sotto-retinico** la siringa per la somministrazione dei vettori AAV trasducendo i fotorecettori e cellule intermedie (epitelio pigmentato).

La terapia genica ha riscontro per:

### Terapia Genica per l'Occhio (cont)

- **Amaurosi congenita di Leber**: è una *retinite pigmentosa* in cui coni e bastoncelli degenerano. Quando la luce colpisce la rodopsina, la reazione che stimola il nervo ottico è *irreversibile* => dev'esserci un *turnover* dei dischi che avviene per fagocitosi da parte delle cellule dell'epitelio pigmentato retinico. Poi saranno sostituiti da nuovi dischi che arrivano in superficie. **Meccanismo di fagocitosi inattivo**: => *fotorecettore degenera*. La cosa inizia a livello dei bastoncelli (che sono più sensibili a causa dell'alto turnover dei dischi) restringendo il campo visivo fino alla cecità. Dal punto di vista istologico vi è un *assottigliamento dello strato dei recettori*, con perdita dell'intero recettore. **Terapia nell'uomo**: AAV RPE65 iniezione sotto-retinica. Si vedono miglioramenti.
- **Retinoschisi**: Difetto genetico per cui le 2 metà della retina non si fondono perfettamente e si hanno bolle a livello sotto-retinico. Approccio classico di terapia genica: rilascio di una proteina mutata (RS1).
- **Coroidoidemia**: Difetti nel gene REP1 (Rag Escort Protein 1). Si ha assottigliamento della retina => degenerazione della retina, trattata con un vettore AAV-REP1.
- **Cecità**: per ristabilire la visione si stimolano direttamente le cellule ganglionari della retina. Qui si usa l'**optogenetica** che converte le cellule ganglionari della retina in fotorecettori trasferendo i geni delle proteine sensibili alla luce.



### Terapia Genica per l'Occhio (cont)

➤ **Age Macular Degeneration, AMD:** La zona della macula e della fovea può degenerare per patologie diverse:

1) **Forma secca:** Atrofia dei recettori. Forma meno grave e più frequente.

2) **Forma umida:** Dovuta a neo-vascolarizzazione retinica, data da iperproduzione di VEGF, in cui i vasi sanguigni invadono la macula => non funzionano bene in quanto iper-permeabili e causano edema, emorragie e cecità. Forma più rara e più grave, anche in progressione. Terapie:

➤ **Aptameri:** Macugen lega il VEGF a 165 amminoacidi e lo blocca, con iniezione intra-vitrea.

➤ **MAB anti-VEGF:** Lucentis, legante tutte le forme di VEGF, con iniezione intra-vitrea.

➤ **Avastin:** sviluppato per tumori al colon, costa meno del Lucentis e ha lo stesso effetto.

➤ **Cellule staminali embrionali:** molto dibattute perchè portano a teratomi.

**Anatomia occhio:** dal **bulbo**, verso la parte più interna dell'occhio, troviamo prima il **nervo ottico**, poi al disotto i fotorecettori, e al disopra un **epitelio pigmentato**.

**Fotorecettori**, lo strato esterno è formato dai dischi in cui sono inserite le proteine utili per la visione:

➤ I bastoncelli contengono solo la rodopsina.

➤ I coni possiedono 3 pigmenti responsabili della visione dei colori (eccitati dalla luce a diverse  $\lambda$ ).

### Terapia Genica del Cuore

Le CVDs comprendono una serie di patologie comprendo:

➤ **ICTUS,**

➤ **ISCHEMIE DEGLI ARTI INFERIORI:** claudicatio, insufficienza trofica da irrorazione => comparsa di ferite che non guariscono, gangrena franca.

➤ **MALATTIE ISCHEMICHE**, come la **cardiomiopatia ischemica**: occlusione di un vaso. Le placche che si formano non necessariamente occludono il vaso ma limitano il flusso di sangue in modo costante. Per riaprire il vaso si usa un palloncino che si rigonfia. Ma c'è complicanza da **RESTENOSI**: processo a livello della tunica media in cui si ha un aumento della proliferazione che porta alla richiusura del vaso. Si risolve con *stent medicati* insieme a *rapamicina* che bloccano la proliferazione, associati ad anticoagulanti..

**ANGIOGENESI** formazione di vasi sanguigni in tessuti adulti, avviene in venule post capillari: **Sprouting**. *Come avviene?*

➤ Il **VEGF** (o **FGF**) induce la degradazione della membrana basale del vaso preesistente e le cellule migrano formando un tubo primitivo che va verso la sede di produzione del VEGF (concentrazione più alta). Questo vaso primitivo è formato da 2 tipi di cellule endoteliali:

### Terapia Genica del Cuore (cont)

1. **tip cells** sul fronte d'invasione del vaso, non proliferano, sentono il gradiente chemiotattico e tramite noch signaling inducono il differenziamento delle cellule vicine in stock cells.

2. **stock cells** altamente proliferative.

➤ Quindi il neo-vaso subirà rimodellamenti: smette di proliferare quando incontra altre cellule che lo rendono indipendente da VEGF e regolano la direzionalità di crescita.

➤ Poi matura grazie a: **angiopoietine, PDGF-B, TGF- $\beta$** .

Delivery di VEGF a livello del cuore per via:

- ▶ intravenosa
- ▶ intracoronarica
- ▶ Direttamente nel cuore dall'endocardio o dall'esterno
- ▶ Intrapericardico per trattare cardiopatia ischemica.
- ▶ Perivascolare (rilascio di VEGF attorno ai vasi).

▶ Iniezione nel al seno coronarico.

Negli arti inferiori:

- ▶ Iniezioni multiple intramuscolari degli arti inferiori
- ▶ Intrarterioso

**Terapia Genica Obbiettivi:**

1. *Indurre neo-angiogenesi* delle aree del miocardio normalmente non ri-vascolarizzabili con le metodiche classiche.
2. *Cardio protection*, dei cardiomiociti vivi.
3. *Rigenesi del miocardio*.



By [deleted]

[cheatography.com/deleted-101164/](https://cheatography.com/deleted-101164/)

Published 23rd November, 2019.

Last updated 1st December, 2019.

Page 2 of 7.

Sponsored by **Readable.com**

Measure your website readability!

<https://readable.com>

### Terapia Genica del Cuore (cont)

#### Terapia per la Neo Angiogenesi

► Uso di biofarmaci: smallRNA o miRNA; **proteine ricombinanti** => sicure ma non efficaci in pazienti con CHD (Chronic heart Disease) e PAOD (Ischemia periferica).  
*Perché?*

△ Per formare un vaso stabile servono almeno 14/30 giorni in cui è attivamente presente VEGF => emivita in vivo insufficiente. Non si hanno problemi di mutagenesi inserzionale, tipica dei vettori retrovirali.

➤ **VEGF come plasmide nudo o con**

**Adenovirus** iniziale risposta positiva => Fase 2 non funziona!. In adenovirus => **risposta infiammatoria elimina le cellule trasdotte!**

➤ **Vettori AAV**: Si usa VEGF sotto controllo di promotore **tet on/off** e **doxiciclina** in vivo per 30 giorni: VEGF è espresso, i vasi si formano e restano anche se poi spegniamo il gene.

**VEGF = Vascular Endotelial Growth Factor** famiglia di proteine. più isoforme, ognuna lega un recettore; il principale: **VEGFR-2/KDR/Fik-1**

**FGF = Fibroblast Growth Factor**

**BYPASS**: Con vena del paziente si fa l'anastomizzazione a monte e a valle della zona occlusa. No in pazienti con malattie multi-vasali quindi nel tempo hanno scompenso cardiaco.

**Sistema NOGA**: mappatura elettro-meccanica del cuore e rilascio di fattori terapeutici nel miocardio.

### Terapia Genica del Muscolo

**Distrofia muscolare**: alterazione delle proteine del complesso DGC che coinvolge la *distrofina* proteina con peso di 427kDa; **2,4 Mbp** di cui la coding region **11kbp**.

Due forme cliniche: **DMD e DMB**.

**DMD**: proteina tronca o instabile quindi non funzionante. *terapia*: Corticosteroidi per alleviare i sintomi.

**BMD**: delezione dei siti centrali della distrofina senza compromettere i domini N-t (che lega l'actina) e C-t ( Che lega il complesso DGC). Qui la distrofina è più piccola ma funzionante: patologia meno grave della DMD.

**Terapia Genica**: Trasforma la DMD in DMB. però il gene della distrofina è molto grande e ci sono problemi a inserirlo interamente.

**Vettore di scelta**: AAV, anche se piccolo => *produzione di una distrofina più piccola*: Mini- distrofine (6kbp) e Micro-distrofine (4kbp) con entrambe N-t e C-t.

Altre terapie:

**exon skipping**: oligonucleotidi antisense, ristabilisce il frame di lettura, esclude uno o più esoni dalla traduzione. Risultato: distrofina più corta, ma funzionale.

**Genome-editing**: CRISPR/Cas9.

**Muscle building strategy 1 => NON**

**FUNZIONA!** *L'utrofina*= proteina omologa della distrofina (funzionale e strutturale) . Si fa con AAV.

**Muscle building strategy 2**: sull'asse fallis-tatina-miostatina. La 1° inibisce la 2°.

### Differenza tra...

#### Animali Knock-out

Animale in cui è soppressa, l'espressione di un determinato gene.

#### Animali Knock-in

Animale in cui si **sostituisce una sequenza endogena con un'altra sequenza** e ci permette per esempio di studiare l'effetto della mutazione.

#### Animali Transgenici

È inserito un gene in un animale e si **aumenta la sua espressione**. I geni inseriti possono essere anche di un altro animale, e *s'integrano casualmente*.

### Terapia Genica del SNC

**Vettore di scelta**: AAV.

**Obbiettivi**: controllare i sintomi; promuovere la rigenerazione e sopravvivenza dei neuroni; o rimpiazzare la funzione del gene mancante.

**Fattori Neurotrofici**:

➤ **Nurotrofine**: *NGF* (Nerve Growth Factor), *BDGF* (Brain Derived Growth Factor), *NeuroTrofine 3 e 4*. Legano recettori Tyr-kinasici o **TRK** sulla membrana dei neuroni. Questi si associano in eterodimerizzazione con un altro recettore della stessa famiglia: **p75**. *Ognuno dei Trk può legare uno dei membri delle neurotrofine, mentre tutti sono in grado di legare il recettore p75*.

➤ **Famiglia di GDNF** (Glial Drived Neurotrophin Factor): *GDNF*, *neuroturtina (NTN)*, *artemina (ART)*, *persefina (PSP)*.

C

By [deleted]

[cheatography.com/deleted-101164/](https://cheatography.com/deleted-101164/)

Published 23rd November, 2019.

Last updated 1st December, 2019.

Page 3 of 7.

Sponsored by **Readable.com**

Measure your website readability!

<https://readable.com>

### Terapia Genica del SNC (cont)

➤ **Famiglia del CNTF/LIF** (Ciliary Derived Neurotrophic Factors e Leukemia Inhibitory factor).

➤ **Alzheimer:** Atrofia cerebrale diffusa a causa della perdita di neuroni colinergici prima nell'ippocampo e poi della corteccia cerebrale. **Terapie:**

1) *somministrazione di NGF* per il modello di trattamento in animali => Effetti benefici:

- Protezione dei neuroni colinergici dopo una axotomia;
- Reversione dell'atrofia legata all'invecchiamento;
- Migliora memoria e apprendimento.

2) *Trial clinici con NGF come proteina ricombinate (rNGF):* somministrata per via centrale.

3) **Delivery Genico:** Vettori virali (retrovirus di Moloney) ex vivo => prelievo fibroblasti autologhi, trasdotti con retrovirus che esprime NGF, e reimpianto nel cervello del paziente. Risultato: aumento del metabolismo cellulare del glucosio e formazione di neuroni colinergici => Minore declino cognitivo.

4) *Studio in fase 1 con il CERE-110:* Risultati => **non funziona!** C'è un **bias sulle metodiche di sperimentazione.**

*NB* i neuroni non perennemente stimolati muoiono tramite apoptosi. Si può contrastare con l'uso di fattori di crescita che promuovono la sopravvivenza: **Fattori Neurotrofici.**

### Terapia Genica: Morbo di Parkinson

Dovuto alla perdita di neuroni dopaminergici della sostanza Nigra.

4 possibilità di terapia genica:

➤ **AAV:** trasdurre geni che aumentino la dopamina: attività dopaminergica aumentata, sui sintomi non ci sono miglioramenti;

➤ Interferire con l'aggregazione proteica;

➤ Produzione e **delivery di fattori neurotrofici;**

➤ **AAV-GAD:** introducono geni che producono GABA per regolare l'attività dei nuclei sotto-talamici. L'enzima GAD produce i GABA.

*Fase 1:* iniezione unilaterale di AAV-GAD.

**Risultati** => riduzione di assunzione di Levodopa e miglioramento bilaterale!

*Fase 2:* Iniezione bilaterale, valutazione sicurezza e metabolismo dei neuroni.

#### Terapie attuali:

1) Somministrazione della *Levodopa* (farmaco analogo del precursore della dopamina, che agisce sullo striato) associata alla *Carbidopa* (inibitore delle carbossilasi periferiche, che altrimenti inattiverebbero il farmaco). => perde efficacia nel tempo = **Più effetti collaterali!**

2) *Deep Brain Stimulation* Si danno scariche elettriche per tenere sotto controllo l'iperexcitabilità dei neuroni sotto-talamici. => Trattamento autogestibile in pazienti giovani.

### Terapia Genica del cuore 2

#### TET-ON e TET-OFF:

➤ **TET-off:** ci sono due vettori:

1. Ha **tTA (transattivatore)** fuso a **VP16** (espressione costitutiva);
2. Ha il **gene terapeutico** legato ad un promotore artificiale che è formato in parte è **CMV** e per il resto lega l'operatore tTET. Nel sistema quando **non c'è tetraciclina** tTA libero si lega a tetO e lo esprime; in **presenza di tetraciclina** lega tTA impedendogli di legare l'operatore => **l'espressione non avviene;**

➤ **TET-on:** ci sono di nuovo i due vettori con le stesse caratteristiche ma con un controllo inverso => se **c'è tetraciclina** si **lega a tTA** e solo così **tTA è capace di legarsi all'operatore** e quindi il **gene si esprime.**

#### Terapie per lo scompenso cardiaco

*Obbiettiva:* neo-rivascolarizzazione di un arto o cuore ischemico.

*Sperimentazione animale.* Modello di cane instrumentato con un occlusore idraulico nelle coronarie. Nella regione irrorata da quella coronaria così come in una regione più remota sono posizionanti dei **crystalli piezoelettrici**. Il loro movimento è monitorabile => registra parametri fisiologici. Si induce un piccolo infarto al cui bordo è state iniettato AAV di controllo o esprimenti con VEGF.



### Terapia Genica del cuore 2 (cont)

Si monitora la contrattilità del cuore e, in presenza di una zona infartuata, si ha l'allontanamento dei 2 cristalli in sistole => shortening negativo. **In animali trattati con VEGF => ripresa della contrattilità fino all'80%. => Effetto diretto sui miocardiociti..**

➤ Studiando i recettori di VEGF, in modelli animali, si è visto che iniettando AAV con il recettore **VEGFb** si è in grado di **ripristinare e prevenire lo scompenso cardiaco**.

**Difetti della Serca2a**=> aumento di calcio porta a contrazione meno efficace, soluzioni possibili:

- ▶ Inibizione del fosfolambano => inibisce l'ATPasi SERCA2a
- ▶ Indurre una maggiore espressione della pompa SERCA2a: con **AAV1** => non funziona!
- ▶ Modulazione dell'attività  $\beta$ -adrenergica (più adrenalina più rilascio di calcio)
- ▶ Esprimere proteine che possano avere un effetto cardio-protettivo (VEGF e IGF1).

### Terapia genica per la rigenerazione del cuore

I miocardiociti hanno un minimo potenziale rigenerativo che potrebbe essere riattivato, dopo il suo spegnimento nella 1° settimana di vita. (Studi con C14)

### Terapia Genica del cuore 2 (cont)

➤ I **miRNA** sono down (o up) regolati in seguito a scompenso cardiaco, e regolano la capacità proliferativa dei miocardiociti durante lo sviluppo. Esistono marker di proliferazione cellulare: **miR199a e miR590** evidenziati con **EDu** e l' **$\alpha$ -actinina** in topo.

**Aurora B** è un marker di citochinesi. In vettori che usano miRNA ai bordi di zone infartuate => si preserva funzione e la struttura, quindi rigenerazione.

➤ **Target** dei miRNA: silenziano simultaneamente *geni per proteine di assemblaggio della struttura sarcomerica e citoscheletrica*.

**Disassemblare il sarcomero** => segnale che elimina l'**hippo pathway**.

➤ **Esperimenti su maiale**: Quelli che hanno ricevuto AAV che esprime il miRNA dopo l'infarto hanno un cuore relativamente normale (lievi aree ipocinetiche) ma dopo due settimane presentano **aritmia o cluster di cellule proliferanti** causa => espressione di miRNA per lungo tempo => **de differenziazione delle cellule cardiache** che hanno sviluppato delle strutture simili a tumori. Quindi si pensa ora di somministrare i miRNA come **minis**, cioè piccole molecole più sicure: in piccoli animali funzionano (restano per 12 giorni).

Recettori:

**VEGF-R2**= principale recettore angiogenico localizzato in corrispondenza dei vasi.

**VEGF-R1**= localizzazione miocardiocitaria, entro la struttura del disco intercalare.

Fattori: (entrambi hanno effetto cardio-protettivo)

**VEGFa** lega sia VEGF-R1 che il VEGF-R2

**VEGFb** lega solo il recettore 1.

### Terapia Genica dell'Emofilia

Patologia **X-Linked** dovute alla mancanza o al malfunzionamento di alcune delle proteine della coagulazione. Due forme: **Emofilia A**: dovuta a un difetto del gene che codifica per il Fattore VIII.

**Emofilia B**: dovuta a un difetto del Fattore IX.

Terapia *sostitutiva*: trasfusione di sangue.

**Terapia genica**: Basta una correzione del 10-50% per ristabilire il fenotipo normale.

**Vettore di scelta**: AAV: il fattore 8° è troppo grande per essere inserito, ma per il 9° va bene. Se iniettato nel muscolo il fattore 9° porta ad aumento di sintesi di fattore 9° a livello locale; ma non avviene ciò nel fegato a causa di ab-anti AAV che causavano infiammazione epatica.

➤ In pazienti con emofilia B severa trattati con **AAV8**, nel fegato, e usando vettori **scAAV**(self complementary AAV), ed un **fattore IX-codon optimized** cioè con più proteina e più stabile rispetto alla wt, si è riscontrato nel tempo un'espressione tra il 2 ed il 11%. Nel 2014 i 6 soggetti sono liberi dalla terapia sostitutiva.

➤ Si sono fatti anche studi per l'emofilia A e si è sviluppato un sistema dove si elimina il dominio B del Fattore 8 che si può produrre e clonare nell'AAV 5 (che accomoda geni più grandi).

➤ Si sono scoperti pazienti che hanno un fattore 9 mutato è *più funzionante del normale*. Sono in corso sviluppi anche di un fattore IX-Padua, con sostituzione di 2 nt e un AA, determinando un fattore 9x più attivo di un fattore IX normale.

### Terapia genica SMA e SLA

#### 1) Atrofia Muscolare Spinale (SMA):

Malattia genetica data dal gene **SMN** (Survival Motor Neuron) presente in due tipi di copie: *SMN1* (telomero) e *SMN2* (centromero).

➤ **SMN1** codifica per la proteina SMN, essenziale per la sopravvivenza e il normale funzionamento dei motoneuroni.

➤ I pazienti affetti da SMA hanno un numero variabile di copie di un secondo gene, **SMN2**, codifica per una forma accorciata della proteina SMN, con funzionalità ridotta al 10%. Il n° di copie del gene SMN2 è alla base della grande variabilità della patologia. Tipologie:

- *Tipo 1*: solo 2 copie di SMN sano: 15% di SMN funzionante, è la forma più grave.

- *Tipo 2*: Hanno maggiori quantità di SMN e quindi presentano varianti meno severe della condizione.

- *Tipo 3 e 4*: In età adulta, hanno più proteina, è la forma meno grave.

Terapie con vettori virali:

➤ **AAV9** buoni risultati, ma aumento degli enzimi epatici dato da AAV, che può essere controllato;

➤ **Oligonucleotide anti-senso**: *Nusinersen* interferisce con lo splicing della proteina SMN2 => aumenta la proteina funzionale con buoni risultati in tutte le forme.

**NB**: entrambe sono terapie che alleviano i sintomi ma non guariscono.

#### 2) Sclerosi laterale amiotrofica (SLA):

Malattia sporadica che determina degenerazione dei motoneuroni sia superiori, che inferiori.

### Terapia genica SMA e SLA (cont)

Il decorso di questa patologia può essere rallentato dal trattamento con farmaci glutammato-bloccanti (riluzolo) ma funziona poco o nulla. Il **10% delle forme sono genetiche dominanti** e il gene mutato è l'enzima superossido dismutasi 1 (**SOD1**).

Questo ha 3 isoforme: SOD1 citoplasmatica; 2 mitocondriale; 3 esterna alla cellula. In topi knock-in si osserva una gain-of-function del gene e sintomatologia SLA-like.

Terapie: ➤ In topi **VGF $\delta$**  si hanno sintomi SLA-like, ed esprimono meno VGF a livello spinale. Ottenuti con delezione in una regione sensibile all'ipossia di VEGF. => **No difetti vascolari!** La somministrazione di AAV-VEGF prolunga la vita del topo sia per un'iniezione intramuscolare che per via intra-cerebro-ventricolare. In genere ogni neurone termina con una giunzione neuromuscolare, ma il VEGF dà origine a **multiple giunzioni neuromuscolari**. Con il VEGF pare che queste si stabilizzano a seguito di iper-sprouting assonale..

➤ **VEGF** è nato come fattore neurotrofico ma nell'evoluzione è stato adottato per lo sviluppo dei vasi sanguigni. VEGF è il fattore pleiotropico per eccellenza.

➤ Il cono di crescita del neurone sviluppa dei **filopodi** e **lamellipodi**: estrusioni ricche di recettori per fattori di crescita che stimolano la crescita e ne guidano la direzione di crescita. Queste sono molto simili a quelle delle **tip cells endoteliali**.

### Terapia genica dei Tumori

**Oncogene**: è un gene che porta la cellula verso lo sviluppo di un fenotipo neoplastico

**Oncosoppressore**: è un gene che codifica per prodotti che agiscono negativamente sulla progressione del ciclo cellulare, proteggendo la cellula dall'accumulo di mutazioni potenzialmente tumorali.

**Cancer gene atlas**: ha mappato circa 200 geni coinvolti nella trasformazione neoplastica.

Si può agire su:

➤ **Sulla cellula tumorale** modificandole direttamente, compresi i meccanismi che la trasformano in cellula tumorale. Tramite:

- inibizione della proliferazione,*
- trasferendo geni suicidi in queste,*
- sfruttando *virus oncolitici.*

Le prospettive non sono troppo incoraggianti.

➤ **Sul SI** Attivandolo contro il tumore, e contrastare la crescita delle cellule cancerose (**immuno-gene-therapy**). Si fa con:

a) aumento della **stimolazione antigenica** da parte del cancro,

b) aumentare la **risposta delle cellule T citotossiche**

c) Modificare le cellule T citotossiche **effettrici attive** contro le cellule tumorali.

Attivando il SI si può aspirare in un'**immunoterapia dei tumori**.

➤ **Sulle cellule staminali ematopoietiche** trasferendo in queste i geni che riducono la tossicità della chemioterapia. Per aumentare l'indice terapeutico della chemioterapia.

### Terapia genica dei Tumori (cont)

▶ **Primi tentativi** : attivazione di oncosoppressori o inattivazione gli oncogeni. => Prima con **oligontd naive** dove si blocca la sintesi di un gene alterato, che altrimenti attiverebbe il ciclo cellulare.

=> Poi si sono usati **oligontd fosfotioati** modificati con sostituzione di un ossigeno con uno zolfo per impedirne la degradazione.

=> Poi con **LNA** (morfolino => knockout in zebrafish) o **PNA**

Risultatom => O! Se sono **molti oligontd** per bloccare gli mRNA di un gene alterato.

▶ **Ribozimi**: struttura a RNA, attività enzimatica, si associano a mRNA lo tagliano e lo distruggono. Due tipi:

1. **Hammerhead** : Si possono associare a qualsiasi sequenza per la quale siano progettati.

2. **A forcina**: Funzionano in modo analogo agli Hammerhead (struttura 3D poco più complessa).

=> Si sono sviluppati per la **Leucemia**

**Mieloide Cronica** ma sono stati rimpiazzati dal Gleevec che inibisce la chinasi ibrida Bcr-Abl.

▶ **iRNA**: sistema endogeno di silenziamento degli RNA.

▶ **Pro drug therapy**: con **profarmaci** sfrutta il meccanismo dell'Herpes simplex. I farmaci si attivano con la timidina kinasi, presente nelle cellule infette, tramite fosforilazione. => è incorporato nella catena nascente del DNA e porta la cellula alla morte.

### Terapia genica dei Tumori (cont)

=> *non fa niente alle cellule sane, ma uccide selettivamente quelle infettate dal virus.*(profarmaco: **Ganciclovir**=> funziona in topo ma non in uomo => **effetto bystander**: responsabile della replicazione tumorale in animali, le cellule infettate che muoiono rilasciano metaboliti tossici che entrano nelle cellule vicine. => effetto positivo in topo, ma non è presente nell'uomo!). ▶ **Virus Oncolitici** Si è visto che in soggetti con tumore in un certo stadio, se contraevano patologie virali e poi guarivano, erano anche guariti dal tumore! => Si può usare direttamente il virus per uccidere il tumore! Funzionano bene associati a chemioterapia.

Uso di **Adenovirus**: esprime **E1A** (ma non E1B). Nei tumori p53 non è attivo => ciclo replicativo del virus = **morte cellule tumorali**, **il virus si diffonde ad altre** ( nelle sane invece p53 è attivo e si induce apoptosi) **ONYX015**: iniettato in modo intratumorale e privo di E1B => effetto **citopatico selettivo per le cellule p53 negative**.

▶ **Immunoterapia dei Tumori**: poco efficace

Target: cellule tumorali; **rafforza il SI**  
Sfrutta: **Tal** (che fanno homing nel tumore)  
=> per tumori metastatici

Meccanismo: **aumento proliferazione dei linfociti**, esposizione ad **antigeni di superficie tumorali specifici**.

### Terapia genica dei Tumori (cont)

Tipologia: **Attiva** stimolazione diretta del SI  
=> **DNA Vaccination**: sia risposte *umorali*, sia *citotossiche*. Usa **Gene Gun**  
Vettore di scelta: **Adenovirus** genoma abbastanza grande in cui può essere facilmente introdotto il gene terapeutico. Quelli di 1° e 2° gen sono usati per far esprimere gli antigeni tumorali o stimolare risposta del SI con **citochinine** (stimolano la proliferazione dei linfociti)

▶ **Ignegnerizzare Linfociti T citotossici**  
I linfociti t hanno un antigene per **TCR**, funziona in associazione al **CD3** => attiva la chinasi **ZAP70** => segnale di attivazione della risposta linfocitaria.

Si crea la molecola artificiale **Car** che permette a tutti i linfociti di targettare i tumori. Struttura della Car:

1) esterno ha il **dominio di riconoscimento dell'antigene tumorale**  
2) interno il **sistema di segnalazione ZAP70**  
Vettore: Virus **lentivirali/retrovirus che esprimono Car** per Linfociti T citotossici.

Risultato: Buono se il tumore esprime molti antigeni specifici!

**Eterogeneità tumorale**: non tutte le cellule tumorali sono uguali.

**Cancer stem cells**: hanno un alto potenziale proliferativo.

**locked nucleic acids = LNA**

**PNA = peptide nucleic acid**

**Proteine Adenovirus**:

▶ **E1A**: effetto pro-proliferativo => attiva p53

▶ **E1B**: blocca p53 => il virus fa ciclo litico  
**TAL = Tumour Associate Lymphocyte** fanno homing nel tumore

**TCR = T Cell Receptor**

**Car = chimeric antigen receptor**