

- **ITALIA - Staminali. Sostituire cromosoma difettoso con uno sano, 3 dicembre 2015**

CNR: Terapia genica, cambiare tutto si può

Comunicato Stampa



Roma, 3 dicembre 2015 - Sostituire un cromosoma sano al posto di uno malato all'interno di una cellula? Ora è possibile grazie a un esperimento realizzato dall'Istituto di ricerca genetica e biomedica del Consiglio nazionale delle ricerche (Irgb-Cnr) di Milano nel gruppo 'Genoma umano', Istituto clinico Humanitas, di Rozzano (Mi) e illustrato sulla rivista Oncotarget. Il team di ricerca, guidato da Paolo

Vezzoni, Anna Villa e Marianna Paulis, è riuscito per la prima volta a sostituire un cromosoma difettoso con uno sano, all'interno di una cellula staminale di mammifero, in particolare, un topo.

“Mutazioni dannose nel DNA provocano malattie genetiche. La terapia genica convenzionale non è in grado di curare, neanche in linea teorica, tutte le alterazioni genetiche poiché non consente il trasferimento di grandi porzioni di DNA. In particolare, sinora, non può nulla contro alterazioni cromosomiche importanti come, ad esempio, la mancanza di un intero cromosoma o una grossa delezione. Queste particolari anomalie potrebbero tuttavia essere curate se fossimo in grado di sostituire l'intero cromosoma difettoso con una sua copia sana”, spiega Vezzoni. “Nel nostro esperimento il cromosoma da eliminare era portatore di una grave variazione genica che nell'uomo provoca la sindrome di Lesch Nyhan”.

Il gruppo ha utilizzato la metodica delle microcellule: “un cromosoma X esogeno, trasportato da una microcellula vettore, è stato introdotto nelle cellule con cromosoma X malato. La presenza di una copia sana del gene originariamente difettoso ha così permesso di risolvere il difetto funzionale”, conclude Vezzoni. La novità fondamentale sta nella possibilità di eliminare il corrispettivo cromosoma endogeno, così che la cellula trapiantata possieda un normale corredo cromosomico, diventando cioè una cellula

sana a tutti gli effetti. “Ci siamo concentrati sul cromosoma sessuale X perché numerose malattie genetiche sono causate proprio da alterazioni di questo cromosoma, come ad esempio alcune varianti di distrofia muscolare o l'emofilia. Inoltre, questo tipo di approccio mostra per la prima volta come sia possibile sostituire un intero volume dell'enciclopedia genomica aprendo una nuova strada al trattamento di malattie genetiche”.

Sostituire un cromosoma difettoso con uno sano che, eliminando il cromosoma malato, rende la cellula sana a tutti gli effetti. E' l'esperimento condotto dall'Istituto di ricerca genetica e biomedica del Consiglio nazionale delle ricerche (Irgb-Cnr) di Milano nel gruppo 'Genoma umano', Istituto clinico Humanitas, di Rozzano (Mi) - illustrato sulla rivista "Oncotarget" - che apre nuove prospettive per il trattamento di malattie genetiche.

Il team di ricerca, guidato da Paolo Vezzoni, Anna Villa e Marianna Paulis, è riuscito per la prima volta a sostituire un cromosoma difettoso con uno sano, all'interno di una cellula staminale di mammifero, in particolare, un topo. "Nel nostro esperimento il cromosoma da eliminare era portatore di una grave variazione genica che nell'uomo provoca la sindrome di Lesch Nyhan", spiega Vezzoni.

"Mutazioni dannose nel DNA provocano malattie genetiche. La terapia genica convenzionale non è in grado di curare, neanche in linea teorica, tutte le alterazioni genetiche poiché non consente il trasferimento di grandi porzioni di DNA. In particolare, sinora, non può nulla contro alterazioni cromosomiche importanti come, ad esempio, la mancanza di un intero cromosoma o una grossa delezione. Queste particolari anomalie potrebbero tuttavia essere curate se fossimo in grado di sostituire l'intero cromosoma difettoso con una sua copia sana", spiega Vezzoni.

Per lo studio il gruppo ha utilizzato la metodica delle microcellule: "un cromosoma X esogeno, trasportato da una microcellula vettore, è stato introdotto nelle cellule con cromosoma X malato. La presenza di una copia sana del gene originariamente difettoso ha così permesso di risolvere il difetto funzionale", conclude Vezzoni. La novità fondamentale sta nella possibilità di eliminare il corrispettivo cromosoma endogeno, così che la cellula trapiantata possieda un normale corredo cromosomico, diventando cioè una cellula sana a tutti gli effetti.

"Ci siamo concentrati sul cromosoma sessuale X perché numerose malattie genetiche sono causate proprio da alterazioni di questo cromosoma, come ad esempio alcune varianti di distrofia muscolare o l'emofilia. Inoltre, questo tipo di approccio mostra per la prima volta come sia possibile sostituire un intero volume dell'enciclopedia genomica aprendo una nuova strada al trattamento di malattie genetiche".

- **ITALIA - Staminali e terapie geniche. MolMed autorizzata a nuovi farmaci, 1 dicembre 2015 11:01**

MolMed, la società di biotecnologie quotata nata nell'ospedale San Raffaele di Milano, ha ricevuto dall'Agenzia Italiana del Farmaco (Aifa) l'autorizzazione a produrre per la commercializzazione medicinali dedicati a una specifica terapia genica basata su cellule staminali geneticamente modificate, e a una specifica terapia cellulare basata sull'ingegnerizzazione del sistema immunitario. Lo annuncia una nota. L'autorizzazione riguarda la facility operativa a Milano, presso il Dipartimento di Biotecnologie dell'Ospedale San Raffaele, e potrà diventare operativa a valle dell'esito di ciascuna delle istanze di autorizzazione all'immissione in commercio, attualmente depositate presso la

European Medicines Agency (Ema). Solo l'autorizzazione alla commercializzazione di ciascuna specifica terapia da parte dell'autorità regolatoria europea ne consentirà l'immissione sul mercato. L'autorizzazione si aggiunge al rinnovo di quella già concessa alla stessa facility per la produzione di medicinali sperimentali.

- **Leucemia: terapia genica cura bimba di un anno, malata terminale. Londra, 9 novembre 2015**

La piccola è ora guarita grazie ad un'innovativa terapia genetico/cellulare definita da ricercatori britannici e dalla società francese di biotech Cellectis che - in sintesi - ha creato per lei nuove cellule immunitarie, " invisibili" alle difese della malattia, e disegnate appositamente per distruggere le cellule



Nel Regno Unito una bambina di un anno, per la quale i medici che l'avevano in cura avevano perso ogni speranza e l'avevano data per spacciata, è stata del tutto curata, primo caso al mondo, dalla sua forma di leucemia (cancro del sangue) incurabile e particolarmente aggressiva. Il tutto grazie ad un'innovativa terapia genetico/cellulare definita da ricercatori britannici e dalla società francese di

biotech Cellectis che - in sintesi - ha creato per lei nuove cellule immunitarie, " invisibili" alle difese della malattia, e disegnate appositamente per distruggere le cellule leucemiche o 'blasti'.

La piccola aveva provato, ed erano ormai esauriti, tutti i trattamenti possibili, quando i medici Great Ormond Street Hospital (GOSH) le somministrarono la terapia altamente sperimentale di cellule modificate geneticamente in una singola piccola dose di 1 mm per infusione. Solo due mesi dopo non c'era più alcuna traccia della leucemia e ora è a casa. Il professore Paul Veys, direttore del centro per il trapianto del midollo (una delle tecniche usate nel trattamento della leucemia) al GHosh ha parlato di " quasi un miracolo".

Il trattamento di ingegneria genica cellulare è stato messo a punto dai ricercatori del Gosh e dell'University College London (UCL) insieme alla società di biotech francese Cellectis, che ora ha deciso di finanziare trial clinici che inizieranno il prossimo anno. **La tecnica prevede di aggiungere due nuove geni a cellule linfociti T (globuli bianchi) da un donatore sano, che li rendono armi imbattibili contro la leucemia.** Usando una tecnologia di ingegneria genetica chiama Talen, che agisce come una " forbice molecolare", geni specifici sono stati rimossi per alterare in modo utile i linfociti T: prima di tutto sono stati resi " invisibili" ad una potente sostanza sviluppata dalla leucemia che normalmente

eliminarrebbe i linfociti T malati; dopo questi ultimi sono riprogrammati solo per colpire e uccidere le cellule della leucemia.

- **IRGB-CNR: Dalla pelle alle ossa, un passo in avanti della genetica, Roma, 23 ottobre 2015**

Comunicato stampa - Uno studio dell'Irgb-Cnr pubblicato su *Stem Cell Reports* apre nuovi sviluppi per la cura delle malattie genetiche attraverso cellule staminali generate dalla pelle. I ricercatori hanno corretto il difetto che causa una grave malattia delle ossa, l'osteopetrosi, sostituendo nelle cellule il gene mutato con il gene sano

L'osteopetrosi, detta anche malattia 'delle ossa di marmo', è una patologia genetica che comporta un aumento eccessivo della densità ossea a causa del malfunzionamento di un gene contenuto in un tipo di cellule ossee chiamate osteoclasti. I ricercatori dell'Istituto di ricerca genetica e biomedica del Consiglio nazionale delle ricerche (Irgb-Cnr) di Milano sono riusciti a identificare il gene coinvolto, a correggerlo, e infine a generare una coltura di osteoclasti sani a partire da cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC), cioè con capacità di dare origine a qualsiasi tessuto, ricavate da cellule della pelle.

I risultati di questa ricerca, pubblicata su *Stem Cell Reports* e svolta in collaborazione con l'Istituto clinico Humanitas, oltre a dare un fondamentale contributo nella lotta contro l'osteopetrosi, aprono prospettive per lo sviluppo di terapie rivolte a pazienti con altre gravi malattie genetiche curabili soltanto con il trapianto di midollo osseo.

“Seguendo una metodologia simile a quella descritta da Shinya Yamanaka e premiata col Nobel nel 2012, abbiamo generato cellule staminali pluripotenti indotte riprogrammando cellule difettose ottenute dalla pelle di un modello murino affetto da osteopetrosi”, spiega la ricercatrice dell'Irgb-Cnr Anna Villa. “I responsabili della malattia sono stati individuati nella prima fase dello studio come mutazioni del gene *Tcirg1* contenuto negli osteoclasti, cellule che disgregano la matrice ossea agendo in contrapposizione a quelle che invece la generano (gli osteoblasti): grazie a questo complesso equilibrio la massa dello scheletro si rigenera, rinnovandosi ogni anno del 10% circa. La porzione di DNA di queste cellule con mutazioni del gene *Tcirg1* è stata poi sostituita con la corrispondente regione sana, ottenendo cellule staminali prive del difetto genetico. Dalle iPSC sono state prima 'coltivate' cellule del sangue, poi spinte a differenziarsi in osteoclasti con ritrovata funzionalità”.

La messa a punto di terapie cellulari autologhe, cioè con cellule del paziente stesso, attraverso l'uso di iPSC rappresenterebbe una svolta per la cura delle malattie genetiche, “sia come risposta alla questione etica sull'uso delle cellule staminali”, conclude Villa, “sia perché, a differenza delle cellule adulte specializzate, le pluripotenti ottenute dalla pelle o dal sangue del paziente possono essere

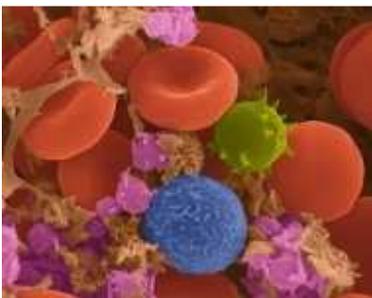
espansive in vitro in grandi quantità e possono essere facilmente modificate grazie alle tecniche di ingegneria genetica: una fonte inesauribile di cellule adatte al trapianto”.

- **Le scorciatoie per produrre cellule del sangue, 9 novembre 2015**

Negli adulti il processo da cui hanno origine le cellule del sangue non segue un cammino strettamente gerarchico, come invece stabilito fino a oggi, ma può percorrere tragitti che possono essere paragonati a scorciatoie. Negli adulti, il processo di differenziamento ematopoietico delle cellule staminali, che cioè dà origine alle cellule del sangue, non segue un cammino strettamente gerarchico, come finora ritenuto, ma ha alcune "scorciatoie". È quanto ha concluso uno studio effettuato da John Dick, dell'Università di Toronto, pubblicato [sulla rivista "Science"](#).

Nel modello classico dell'ematopoiesi, le diverse linee di cellule del sangue hanno origine da un processo che segue uno schema gerarchico, in cui il potenziale di differenziamento va via via riducendosi. Il punto di partenza è rappresentato da cellule multipotenti, da cui hanno origine cellule oligopotenti, che possono differenziarsi cioè solo in poche linee cellulari, e successivamente cellule unipotenti, che possono dare vita a un solo tipo di cellula.

Dick e colleghi hanno studiato, nelle diverse fasi dello sviluppo dell'individuo umano, dal feto all'età adulta, le cellule ematopoietiche multipotenti CD34+ e il loro schema di differenziamento progressivo. Quest'ultimo dà origine innanzitutto ai progenitori mieloidi, che danno origine a una parte notevole delle cellule del sangue, tra cui eritrociti, detti comunemente globuli rossi, oppure megacariociti, responsabili della produzione di piastrine.



Microfotografia in falsi colori delle diverse componenti cellulari del sangue ottenuta a 1200 ingrandimenti (© Dennis Kunkel Microscopy, Inc./Visuals Unlimited/Corbis)

Gli autori hanno così scoperto che il fegato del feto, dove per alcune settimane durante la gestazione avviene l'ematopoiesi, contiene un gran numero di progenitori oligopotenti distinti, tra cui sono mescolati anche cellule mieloidi, eritrociti e megacariociti. Nel midollo osseo dell'individuo adulto invece, il numero di cellule progenitrici oligopotenti è molto limitato: a predominare sono le due classi delle progenitrici multipotenti e unipotenti, e le linee cellulari degli eritrociti e dei megacariociti avevano origine da progenitrici multipotenti.

In sintesi, ciò significa che con l'età adulta c'è un passaggio a una gerarchia a due livelli, non previsto nell'attuale modello dominante dell'ematopoiesi, elaborato a partire dagli anni sessanta.

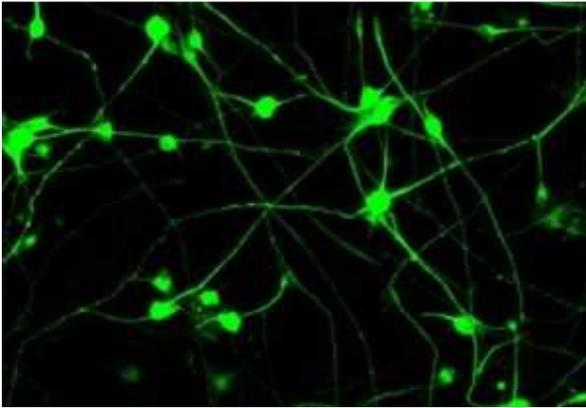
"Grazie a una serie di esperimenti, abbiamo capito come differenti tipi di cellule del sangue si formano rapidamente dalle cellule staminali e non alla fine di tutto il processo di differenziamento gerarchico, come tradizionalmente si riteneva", ha spiegato Dick. "La nostra scoperta permette di capire meglio un'ampia gamma di malattie ematologiche, dall'anemia, cioè una riduzione patologica di emoglobina del sangue, alla leucemia, che è la proliferazione incontrollata di cellule del sangue: è un po' come passare dalla televisione in bianco e nero a quella a colori".

- **Da pelle a neuroni, una via chimica alla riprogrammazione cellulare, 6 agosto 2015**

E' possibile trasformare cellule della pelle umane e di topo in neuroni utilizzando solo un cocktail di piccole molecole, senza passare dallo stadio di pluripotenza e senza ricorrere ai fattori trascrizionali necessari alla tecnica convenzionale di riprogrammazione cellulare. Lo hanno dimostrato due ricerche indipendenti che rappresentano un primo passo verso terapie cellulari sostitutive per malattie degenerative del sistema nervoso. Le cellule della pelle possono essere trasformate in neuroni utilizzando solo un cocktail di molecole: lo hanno dimostrato due ricerche tra loro indipendenti, descritte sulla rivista "Cell - Stem Cell" utilizzando fibroblasti umani e di topo. Il risultato rafforza l'idea che un approccio puramente chimico sia una via promettente per gli studi sulla riprogrammazione delle cellule staminali, in grado di evitare i problemi tecnici e di sicurezza associati ai metodi tradizionali che sfruttano i fattori di trascrizione.

Uno dei filoni più promettenti della medicina rigenerativa riguarda la possibilità di far ripercorrere a ritroso il cammino di differenziazione di cellule adulte, come i fibroblasti, riportandole allo stadio di staminali. Questo processo viene indotto forzando le cellule adulte a esprimere specifici fattori di trascrizione, proteine che legandosi al DNA guidano la trascrizione dei geni, determinando il momento in cui devono essere attivati o disattivati, e quindi influenzando il destino della cellula.

I prodotti finali di questo processo sono le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC), cellule non ancora differenziate che sono in grado di maturare e dare origine a diversi tipi di cellule somatiche mature. Alcuni anni fa è stata dimostrata anche la possibilità di bypassare lo stadio di pluripotenza, trasformando cellule somatiche adulte direttamente in cellule cardiache, epatiche e neuronali, sempre utilizzando i fattori di trascrizione ma in modo molto più mirato.



Microfotografia in bioluminescenza dei neuroni di topo ottenuti in uno dei due studi (Cortesia Hong Kui Deng)

Una delle maggiori difficoltà che s'incontrano nelle ricerche sulla riprogrammazione delle cellule staminali è che le cellule mature vengono forzate a cambiare identità mediante una manipolazione genetica che può dare esiti infausti: per esempio, cellule apparentemente normali, ma con attività interne differenti rispetto alle loro controparti naturali. Per questo di recente sono stati sperimentati diversi metodi per fare a meno dei fattori di trascrizione, utilizzando solo piccole molecole in grado di permeare le pareti cellulari e avviare la riprogrammazione.

[Nel primo articolo](#), Jian Zhao e colleghi dell'Università di Tongji, mostrano che il protocollo di riprogrammazione puramente chimico può essere utilizzato per produrre neuroni da fibroblasti umani, ricavati dalla cute di pazienti affetti da Alzheimer. Il metodo rappresenta una valida alternativa per la modellizzazione della malattia ed è un primo passo verso una futura terapia di sostituzione delle cellule colpite da diverse patologie neurologiche.

“Coordinando i molteplici cammini di segnalazione, queste piccole molecole modulano l'espressione genica dei fattori trascrizionali e perciò promuovono la transizione verso la cellula neuronale”, ha spiegato Zhao.

[Nel secondo studio](#), Hongkui Deng, della Peking University, e colleghi, hanno scoperto che la molecola denominata I-BET151 è un elemento chiave per sopprimere la trascrizione nei fibroblasti di topo, inducendoli poi a ri-differenziarsi in neuroni.

“Le molecole che usiamo nel nostro approccio chimico sono economiche e facili da sintetizzare, preservare e standardizzare”, ha spiegato Deng. “Inoltre, i loro effetti sono reversibili e regolabili in modo accurato variandone la concentrazione: stiamo cercando di produrre specifici sottotipi neuronali che potrebbero essere utilizzati per particolari esigenze cliniche nell'ambito della medicina rigenerativa”.

- **Verso una produzione di massa di cellule staminali, 27 luglio 2015**

Le cellule staminali embrionali umane pluripotenti potranno essere prodotte a miliardi grazie a un nuovo substrato di coltura completamente sintetico. La nuova tecnica potrebbe risultare estremamente utile nel campo della medicina rigenerativa, una volta che gli studi clinici avranno dimostrato l'efficacia e la sicurezza di queste cellule nella riparazione di tessuti danneggiati dalle malattie, dai traumi o dall'invecchiamento. Un infarto rappresenta per il cuore una perdita di circa cinque miliardi di cellule. In futuro, anche una perdita così ingente di cellule funzionali potrebbe essere alla portata degli interventi di medicina rigenerativa, grazie al risultato di [un nuovo studio pubblicato sulla rivista "Advanced Materials"](#) a firma di Adam Celiz dell'Università di Nottingham, nel Regno Unito, e colleghi di una collaborazione internazionale, che dimostra la possibilità di produrre cellule staminali embrionali in modo massiccio grazie a un nuovo tipo di substrato di coltura.



Rappresentazione artistica di una cellula staminale embrionale umana (© Science Picture Company/Science Picture Co./Corbis)

La medicina rigenerativa si è affermata negli ultimi anni come una delle branche cliniche più promettenti, grazie soprattutto ai notevoli passi avanti nella produzione e manipolazione delle cellule staminali pluripotenti. Queste cellule infatti possono essere indotte a differenziarsi in diversi tipi di tessuti dell'organismo umano, tanto da far pensare che, una volta arrivati a un certo grado di sviluppo delle tecniche in questo campo, sarà possibile riparare tessuti e organi e danneggiati da malattie, eventi traumatici o semplicemente dall'invecchiamento. L'idea generale è quella di sostituire le cellule con funzionalità compromessa con nuove cellule dello stesso tipo ottenute dalle staminali.

Una delle difficoltà maggiori delle terapie a base di cellule staminali, tuttavia, è produrne le enormi quantità richieste dagli eventi patologici. Celiz e colleghi hanno superato ora questo ostacolo realizzando il primo substrato completamente sintetico che è potenzialmente in grado di sostenere la crescita di miliardi di cellule staminali contemporaneamente.

“Le potenzialità della medicina rigenerativa sono ancora oggetto di ricerca di studi clinici”, ha spiegato Morgan Alexander, direttore del progetto “Discovery of a Novel Polymer for Human Pluripotent Stem Cell Expansion and Multilineage Differentiation”, che ha portato allo sviluppo del materiale. “Qualora

una di queste terapie si rivelasse efficace e sicura nel trattamento di patologie del cuore, del fegato o del cervello, il nostro risultato consentirebbe di produrre queste cellule in gran numero”.

Sui tempi di attuazione dell'ambizioso programma di rendere disponibili gli interventi di medicina rigenerativa c'è ancora molta incertezza, sia per le difficoltà intrinseche alla ricerca sia perché attualmente non è ancora chiaro quale debba essere il loro iter di autorizzazione legale.

“Il campo della medicina rigenerativa ha avuto uno sviluppo esponenziale e nell'arco dei prossimi cinque anni molti più pazienti riceveranno il trattamento a base di cellule staminali”, spiega Chris Denning, che ha partecipato allo studio. “Gli studi clinici sono ancora in una fase iniziale, tuttavia con questo tipo di prodotti si potrebbe arrivare a rendere i trattamenti disponibili ai pazienti entro due o tre anni, purché vengano risolti gli attuali problemi di autorizzazione all'immissione in commercio da parte delle autorità regolatorie”.