

## CAPITOLO 3

# Metodologie per il trasferimento genico

L'esito di qualsiasi approccio di terapia genica, sia che esso preveda l'inoculazione del materiale genetico direttamente *in vivo* sia che venga effettuato *ex vivo* nelle cellule prelevate dal paziente, dipende strettamente dall'efficienza con cui gli acidi nucleici con funzione terapeutica vengono internalizzati dalle cellule bersaglio. Di fatto, l'efficienza del trasferimento genico probabilmente rappresenta a tutt'oggi il parametro più importante che ancora limita le applicazioni di terapia genica, o comunque ne condiziona il successo.

### Barriere cellulari al trasferimento genico

In condizioni normali, il doppio foglietto fosfolipidico, apolare e idrofobico, di cui è composta la membrana plasmatica della cellula, costituisce una barriera impermeabile alle macromolecole polari di grandi dimensioni, quali il DNA o l'RNA. A pH fisiologico, infatti, i fosfati dello scheletro fosfo-glucidico degli acidi nucleici sono deprotonati, quindi dotati di un'uniforme carica negativa. L'entrata di questi poli-anioni nelle cellule, quindi, deve essere opportunamente facilitata, usualmente sfruttando i meccanismi che regolano l'entrata fisiologica di macromolecole all'interno della cellula. Alternativamente, gli acidi nucleici possono essere veicolati all'interno di particelle biologiche, quali i virus, naturalmente capaci di oltrepassare le membrane biologiche.

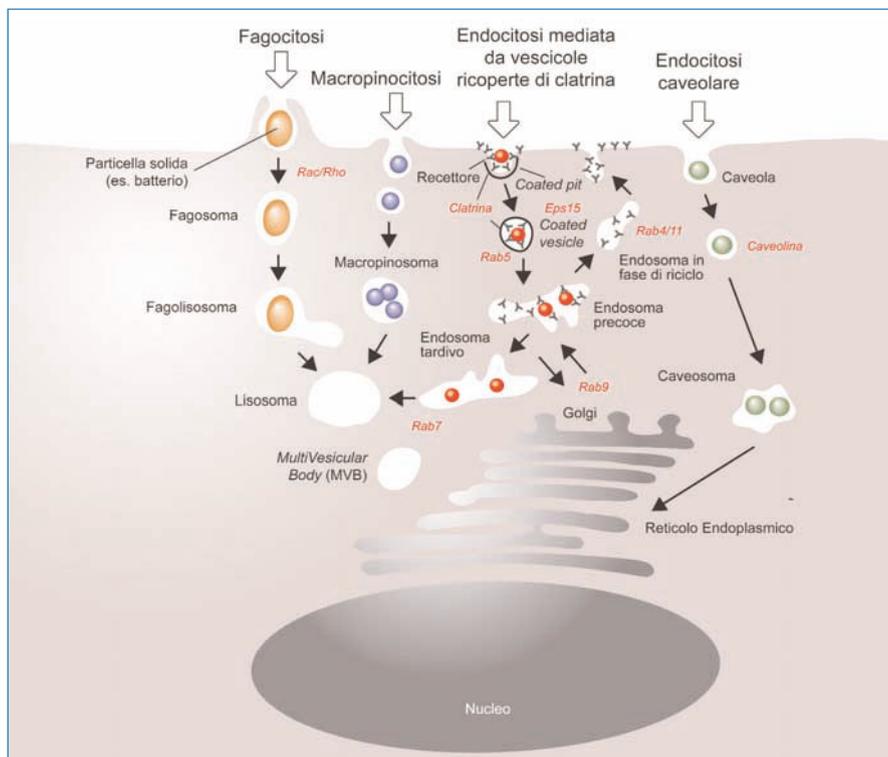
### Endocitosi

In condizioni fisiologiche, l'ingresso di grandi molecole polari all'interno delle cellule avviene attraverso una serie di meccanismi che determinano la formazione, a livello della superficie della cellula, di vescicole circondate da una membrana, seguita dall'internalizzazione di queste vescicole e dal loro trasporto intracellulare. Questo processo è noto con il termine collettivo di "endocitosi". Negli ultimi anni, sono stati descritti diversi meccanismi di endocitosi, che si

distinguono per il tipo di meccanismo molecolare coinvolto e per la dimensione delle particelle internalizzate. I quattro principali tipi di endocitosi sono rappresentati nella Figura 3.1.

La fagocitosi è il processo per il quale alcune cellule eucariote specializzate (nei mammiferi, tipicamente i granulociti neutrofili e i macrofagi) sono in grado di internalizzare particelle di grandi dimensioni (>500 nm di diametro, incluse cellule in apoptosi o batteri). La macropinocitosi è un processo analogo alla fagocitosi, in cui vacuoli di grandi dimensioni, anch'essi tipicamente con un diametro >500 nm, si formano di continuo quale conseguenza dell'invasione della membrana plasmatica. Tali vacuoli, quindi, contengono vari tipi di soluti presenti nell'ambiente extracellulare, comprese diverse proteine che vengono di conseguenza internalizzate in maniera non specifica. Le vescicole che si formano quale conseguenza di entrambi questi tipi di endocitosi alla fine si fondono con i lisosomi, strutture che rappresentano il principale compartimento idrolitico della cellula.

Una terza forma di endocitosi è innescata dal legame a specifici recettori di superficie e caratterizzata dalla formazione di vescicole ricoperte della proteina clatrina. Questo processo, definito quindi endocitosi mediata da vescicole di clatrina o endocitosi mediata da recettore, avviene a carico delle regioni della



**Fig. 3.1.** Endocitosi. Sono indicati in maniera schematica i quattro principali tipi di endocitosi (vedi testo per la descrizione)

membrana plasmatica in cui esistono degli affossamenti ricoperti dalla proteina clatrina (*clathrin coated pits*). Queste regioni contengono specifici recettori che si legano a proteine presenti nell'ambiente extracellulare (ad esempio, transferrina, lipoproteine a bassa densità, alcuni fattori di crescita, anticorpi). Quando questi ligandi interagiscono con i rispettivi recettori, si innesca un processo attivo per cui si vengono a formare delle piccole vescicole (~100 nm di diametro) ricoperte, sul lato citosolico, da un caratteristico complesso di proteine che si associano alla clatrina (*clathrin-coated vesicles*, CCVs). Queste vescicole progressivamente maturano per diventare prima endosomi precoci, che mostrano una caratteristica morfologia tubulo-vescicolare (vescicole fino a 1 µm di diametro connesse da tubuli di ~50 nm di diametro) e possiedono un pH moderatamente acido. All'interno di queste strutture, molti recettori si staccano dai loro ligandi a causa del basso pH e vengono riciclati nuovamente verso superficie della cellula grazie ad un meccanismo di trasporto mediato da vescicole. Molti di questi endosomi precoci invece maturano e diventano endosomi tardivi, che essenzialmente contengono materiale da veicolare nei lisosomi per essere idrolizzato.

Un quarto meccanismo di internalizzazione è rappresentato dalla endocitosi caveolare. Le caveole sono invaginazioni della membrana plasmatica a forma di fiasco, con un diametro di ~50 nm, non ricoperte da clatrina, presenti sulla superficie di molti tipi cellulari, tra cui gli adipociti, le cellule endoteliali, le cellule muscolari lisce e i fibroblasti. Questi microdominii della membrana sono spesso associati alla proteina cellulare caveolina, e corrispondono alle regioni della membrana ricche in colesterolo e sfingolipidi. In conseguenza di tale composizione lipidica, queste regioni sono caratterizzate da diminuita fluidità e rappresentano, quindi, uno dei microdominii delle membrane resistenti alla solubilizzazione con detergenti e collettivamente noti con il termine di *lipid rafts* (zattere lipidiche). Le caveole gemmano dalla membrana plasmatica e determinano la formazione di endosomi contenenti caveolina, chiamati *caveosomi*. Questi hanno un pH neutro e un'emivita lunga, ed alla fine si fondono con le vescicole del reticolo endoplasmico (*endoplasmic reticulum*, ER) o dell'apparato di Golgi, rilasciando quindi il loro contenuto all'interno di questi compartimenti.

È interessante osservare che tutti i tipi di endocitosi, con l'eccezione dell'endocitosi caveolare, alla fine determinano il trasporto del materiale contenuto nelle vescicole all'interno del compartimento lisosomale, dove è destinato a distruzione. Questo concetto è di particolare importanza sia per la terapia genica sia, più in generale, per la somministrazione di altri tipi di molecole con proprietà farmacologica, in quanto evitare la distruzione lisosomale è un prerequisito fondamentale per l'efficacia di qualsiasi trattamento.

### Fuoriuscita dal compartimento vescicolare

Il materiale internalizzato dalla cellula all'interno delle vescicole di endocitosi è ancora al di fuori del citosol, quindi in una sede virtualmente extracellulare. Nel caso degli acidi nucleici, quindi, è assolutamente fondamentale che questi

possano fuoriuscire da questo compartimento, un processo che può avvenire o per distruzione dell'integrità delle membrane degli endosomi o attraverso il passaggio attivo attraverso le stesse. A questo proposito, la natura ha evoluto una serie di meccanismi molecolari che consentono l'ingresso nel citosol di macromolecole contenute in diversi compartimenti vescicolari, meccanismi che sono variamente sfruttati da numerosi microorganismi. In particolare, i virus e le tossine batteriche utilizzano prevalentemente due vie di ingresso per entrare nel citosol, la prima a partire dagli endosomi precoci o tardivi, sfruttando il basso pH di questi compartimenti, e la seconda a partire dall'apparato di Golgi o dall'ER.

Un esempio del primo meccanismo è offerto dalla tossina difterica, per la quale la progressiva acidificazione del pH attiva un cambiamento di conformazione nella tossina, che causa la formazione di pori sulla membrana degli endosomi, consentendo quindi l'ingresso diretto della tossina nel citosol. Il passaggio dal Golgi o dall'ER è invece sfruttato da altre molecole che seguono un percorso inverso a quello della classica via di secrezione. Queste molecole includono diverse tossine delle piante, tra cui la ricina, e dei batteri, tra cui la tossina della *Shigella*, l'esotossina A di *Pseudomonas* e, in parte, la tossina colerica. L'ingresso di queste tossine all'interno della cellula sfrutta, in senso retrogrado, le vie di trasporto che la cellula normalmente usa per la secrezione delle proteine. In particolare, l'ingresso di alcune tossine all'interno della cellula avviene per endocitosi mediata dal legame a specifici recettori cellulari. Una volta all'interno degli endosomi precoci o tardivi, le tossine sfuggono alla degradazione lisosomale reindirizzando le vescicole che le contengono verso il *trans-Golgi network* e, da questo, verso l'ER, direttamente o attraverso l'apparato di Golgi. Quando le tossine raggiungono l'ER, guadagnano accesso al citosol sfruttando il sistema di controllo che normalmente regola la qualità delle proteine sintetizzate all'interno di questo compartimento, sistema noto con il nome di ERAD (*ER-associated protein degradation*). In particolare, il meccanismo dell'ERAD elimina le proteine che assumono una conformazione non corretta reindirizzandole nel citosol attraverso un poro noto con il nome di traslocone Sec61. Diverse tossine utilizzano proprio questo traslocone per accedere al citosol.

Infine, alcuni virus, tra cui poliomavirus, virus dell'influenza, coronavirus ed alcuni ecovirus, analogamente ad altre tossine, tra cui la tossina del colera, sfruttano invece il meccanismo di endocitosi caveolare per penetrare nell'ER.

Nel caso dei virus di interesse per la terapia genica, l'accesso al citosol avviene sia direttamente mediante la fusione del pericapside virale con la membrana plasmatica (come nel caso dei retrovirus) o mediante fuoriuscita dagli endosomi grazie all'attività endosomolitica del capsido virale (come nel caso degli adenovirus e dei AAV).

## Indirizzamento al nucleo

Una volta guadagnatosi l'accesso al citosol, l'acido nucleico deve trovare la sua via verso il compartimento subcellulare nel quale la sua funzione viene esercitata,

solitamente il citosol stesso o il nucleo. I piccoli RNA regolatori sono attivi nel primo compartimento, mentre i geni codificanti devono raggiungere il nucleo per essere trascritti. La destinazione finale dell'acido nucleico è comunemente regolata dalle proteine cui esso si lega nel citosol. Per esempio, gli siRNA vengono caricati sul complesso RISC e rimangono citosolici (vedi sezione sui Piccoli RNA con funzione regolatoria). Nel caso dei virus, sono le proteine che si associano al genoma virale che determinano se e quando l'acido nucleico debba essere trasportato nel nucleo. Nel caso del DNA nudo, invece, questo viene legato da diverse proteine cellulari, tra cui ad esempio fattori di trascrizione che riconoscono il promotore, che possono trasportarlo nel nucleo grazie ai propri segnali di localizzazione nucleare. Alternativamente, il DNA può raggiungere il nucleo durante il processo di mitosi nelle cellule in attiva duplicazione.

### Metodologie per il trasferimento genico per la terapia genica: una visione d'insieme

Le metodologie di trasferimento genico per la terapia genica possono essere suddivise in quattro categorie, che comprendono:

1. il semplice utilizzo di plasmidi (molecole circolari di DNA a doppio filamento covalentemente chiuse) o di corti acidi nucleici regolatori (oligonucleotidi, siRNA ed altri) sotto forma di acidi nucleici "nudi", ovvero non complessati ad altre molecole e semplicemente aggiunti nell'ambiente extracellulare;
2. la facilitazione dell'entrata degli acidi nucleici nelle cellule mediante metodi fisici;
3. la veicolazione degli acidi nucleici mediante lipofezione;
4. l'inserzione degli acidi nucleici all'interno di genomi virali, in modo da sfruttare la naturale capacità dei virus di penetrare all'interno delle cellule.

La Tabella 3.1 riporta una visione sintetica dei principali vantaggi e svantaggi di queste metodologie, caratteristiche che sono analiticamente discusse nelle prossime sezioni.

### Inoculazione diretta di DNA ed RNA

Come già anticipato in precedenza, le caratteristiche biofisiche della membrana plasmatica pongono una barriera pressochè invalicabile al passaggio diretto degli acidi nucleici, specialmente quando questi sono di grandi dimensioni, come i plasmidi. Diversi tipi cellulari, tuttavia, sono in grado di internalizzare spontaneamente corte molecole di RNA o DNA (ad esempio, oligonucleotidi antisense, *decoy*, siRNA), mediante un processo di endocitosi attiva, solitamente mediata dagli endosomi rivestiti di clatrina. Questa proprietà, ancorché altamente inefficace, è alla base alcune sperimentazioni cliniche che utilizzano oligonucleotidi modificati chimicamente o siRNA, somministrati per via ematica o inoculati in compartimenti anatomicamente isolati quali la camera posteriore dell'occhio.

**Tabella 3.1.** Vantaggi e svantaggi dei principali metodi di trasferimento genico usati nella terapia genica

Strategia	Metodo	Vantaggi	Svantaggi
DNA o RNA nudi	Iniezione diretta nei tessuti <i>in vivo</i>	Semplicità di produzione e uso	Efficienza molto modesta
		Poteniale utilizzo per lo sviluppo di vaccini genetici	Effetto transitorio
			Internalizzazione limitata alle cellule muscolari scheletriche e cardiache, o alle APC
Metodi fisici	Elettroporazione	Relativa facilità di allestimento (per il muscolo scheletrico e la cute); invasiva per gli altri organi	Bassa efficienza Effetto transitorio Limitato spettro di applicazioni
	Bombardamento con particelle ricoperte da DNA ( <i>gene gun</i> )	Relativa facilità di allestimento	Limitati al trasferimento genico nella cute
	Iniezione a getto ( <i>jet injection</i> )	Stimolazione di un'efficace risposta immunitaria anticorpale	
	Aumento della pressione idrodinamica	Usualmente invasiva	Efficienza molto modesta Effetto transitorio
	Ultrasuoni	Relativa facilità di allestimento	
Metodi chimici	Lisosomi	Semplicità di allestimento e uso	Efficienza limitata Effetto transitorio
	Lipidi cationici		
	Proteine		
	Polimeri cationici		

Vettori virali	<p>Vettori basati su:                  Oncoretrovirus                  Lentivirus                  Adenovirus                  Virus adeno-associati (AAV)                  Herpesvirus</p>	<p>Alta efficienza di trasferimento genico  <i>in vivo</i> ed <i>ex vivo</i>                  Per taluni vettori, persistenza                  dell'espressione del gene terapeutico</p>	<p>Possibile induzione di una risposta immunitaria e/o infiammatoria                  Capacità di donazione limitata                  Complessità di produzione                  Tropismo limitato a specifici tipi cellulari (tranne gli adenovirus)                  Mutagenesi inserzionale (per i gammaretrovirus e lentivirus)                  Incompleta conoscenza dei meccanismi molecolari di replicazione di alcuni virus</p>
----------------	---	--	--

In alcuni tipi cellulari, il processo di internalizzazione degli acidi nucleici e il loro rilascio all'interno della cellula è relativamente più efficace. Questo è il caso, da un lato delle fibre muscolari striate e dei cardiomiociti, che sono capaci di internalizzare anche il DNA plasmidico semplicemente iniettato *in vivo*, rispettivamente nel muscolo scheletrico e nel cuore e, dall'altro, delle cellule presentanti l'antigene (*antigen presenting cell*, APC), quali i macrofagi e le cellule dendritiche, tra cui le cellule di Langerhans della cute. Questa proprietà è stata utilizzata da alcune applicazioni di terapia genica per l'induzione di angiogenesi terapeutica o per la vaccinazione genetica.

## Metodi fisici

Negli ultimi anni, sono stati compiuti importanti progressi nell'utilizzo di metodi fisici per facilitare l'entrata del DNA plasmidico o di corti DNA o RNA nelle cellule. Questi metodi potenziano l'ingresso degli acidi nucleici portando gli stessi a stretto contatto con la membrana plasmatica e/o causando la temporanea micro-disgregazione della membrana stessa.

### Elettroporazione

L'elettroporazione (anche definita elettropermeabilizzazione o *elettrotransfer*) è stata originariamente sviluppata quale metodo di trasferimento genico nelle cellule in coltura. Successivamente, è stata anche utilizzata *in vivo* per il trasferimento genico nella cute, nel muscolo e nel fegato e, più recentemente, anche in altri tessuti quali il rene, il polmone, il cuore e la retina. La tecnica consiste nell'applicazione di una serie di impulsi elettrici (tipicamente dell'ordine di ~200 V/cm per qualche decina di millisecondi o di voltaggi più elevati per tempi dell'ordine di microsecondi), al fine di rendere permeabile, in maniera transitoria, la membrana plasmatica delle cellule e consentire quindi l'ingresso di macromolecole di grandi dimensioni o cariche elettricamente presenti nell'ambiente extracellulare, tra cui tipicamente il DNA plasmidico.

Una delle limitazioni sostanziali dell'elettroporazione è legata al danno che viene inferto al tessuto in seguito all'applicazione degli impulsi elettrici, danno che in molti tessuti condiziona in maniera importante l'efficacia della metodica. Inoltre, l'espressione del DNA plasmidico internalizzato è solitamente transitoria, e viene persa entro pochi giorni.

### Iniezione idrodinamica intravascolare

Alcuni ricercatori hanno osservato che l'aumento locale transitorio della pressione idrostatica aumenta in maniera significativa l'efficienza di internalizzazione degli acidi nucleici presenti nel sangue. Questa tecnologia, che viene definita

trasferimento genico idrodinamico, può essere applicata a diversi distretti *in vivo*, tra cui il fegato, il muscolo scheletrico e il cuore. L'aumento della pressione idrostatica può essere generata iniettando la soluzione contenente il plasmide, l'oligonucleotide o il siRNA di interesse ad alta pressione nel distretto interessato (ad esempio, nell'arteria femorale se si desidera la trasfezione diffusa dei muscoli dell'arto inferiore), o occludendo transitoriamente le vie di ritorno venoso dell'organo interessato (ad esempio, la vena cava superiore per il diaframma o il seno coronario per il cuore), in modo da aumentare la pressione nel distretto arterioso in cui viene iniettato il gene terapeutico.

## Sonoporazione

Gli ultrasuoni di diversa intensità sono utilizzati clinicamente per diverse applicazioni sia diagnostiche (ecografia) che terapeutiche (litotrissia, distruzione termica dei tumori). Queste diverse modalità di utilizzo degli ultrasuoni possono, in condizioni diverse, facilitare il trasferimento genico di plasmidi ed altre piccole molecole di DNA ed RNA all'interno delle cellule. Questa metodica prende il nome di sonoporazione. Il meccanismo di funzionamento degli ultrasuoni è legato alla loro capacità di generare un fenomeno di cavitazione acustica tale da creare dei micropori nella membrana plasmatica, attraverso i quali gli acidi nucleici vengono rapidamente traslocati all'interno della cellula. La cavitazione viene aumentata da agenti che causano nucleazione, quali i mezzi di contrasto ecografici a base di microbolle gassose.

Le proprietà degli ultrasuoni possono essere utilizzate iniettando un plasmide od un oligonucleotide nel sangue, e focalizzando il fascio di ultrasuoni su un determinato distretto corporeo, tipicamente la parete vascolare, il cuore o il muscolo scheletrico. L'aumento transitorio di permeabilità in questi distretti consente l'ingresso degli acidi nucleici nelle cellule endoteliali della parete vascolare, nei cardiomiociti o nelle fibre muscolari scheletriche.

## Bombardamento con microparticelle ricoperte di DNA (*gene gun*)

Tra i metodi di trasferimento genico che utilizzano principi fisici, appare molto interessante la metodica del bombardamento delle cellule con microscopiche particelle ricoperte di DNA. La variante più usata impiega vere e proprie pistole (*gene gun*) che sparano ad altissima velocità nei tessuti particelle d'oro o di tungsteno su cui è adsorbito un plasmide. Queste particelle sono in grado di attraversare la membrana citoplasmatica e quella nucleare rilasciando il DNA nel nucleo delle cellule del tessuto bersaglio. Questa metodologia, definita "biolistica" o "balistica" deriva da analoghe tecniche originariamente sviluppate per il trasferimento genico nelle piante, al fine di superare la parete cellulare che le cellule di questi organismi presentano. Essa trova applicazione per la terapia genica *in vivo* di tessuti facilmente accessibili, quali la cute, in particolare con lo scopo di

trasferire geni che codificano proteine in grado di stimolare il sistema immunitario, avendo come obiettivo quindi quello della vaccinazione a DNA contro antigeni virali o tumorali mediante trasferimento nelle cellule che presentano l'antigene presenti a livello del derma

### Iniezione di DNA con getti ad alta pressione (*jet injection*)

Sono state recentemente sviluppate anche altre procedure, basate su metodi fisici, per consentire la somministrazione di plasmidi o di siRNA a vari tessuti. Una di queste è la cosiddetta "iniezione a getto" (*jet injection*), che consiste nell'applicazione di una soluzione contenente l'acido nucleico di interesse mediante un getto ad alta pressione. Questa tecnologia appare avere più capacità di penetrazione rispetto al bombardamento biolistico (fino ad 1 cm di profondità), e può essere applicata per il trasferimento genico transitorio alla cute ed ai tessuti immediatamente sottostanti, nonché ad altri tessuti facilmente accessibili. È attualmente in corso uno studio clinico di fase I che prevede l'applicazione di questa metodica per la terapia genica delle metastasi cutanee in pazienti con tumore della mammella e melanoma.

## Metodi chimici

Mentre le metodiche fisiche di trasferimento genico si propongono di facilitare l'ingresso degli acidi nucleici nelle cellule modificando le proprietà delle membrane biologiche mediante forze fisiche quali pressione o elettricità, i metodi chimici mirano invece a cambiare le proprietà degli acidi nucleici stessi mediante il legame con molecole che ne diminuiscano l'idrofilia e ne facilitino quindi il passaggio attraverso le membrane.

Le molecole utilizzate per favorire il trasferimento genico possono essere classificate in lipidi (liposomi e lipidi cationici), proteine e polimeri cationici.

### Liposomi e lipidi cationici

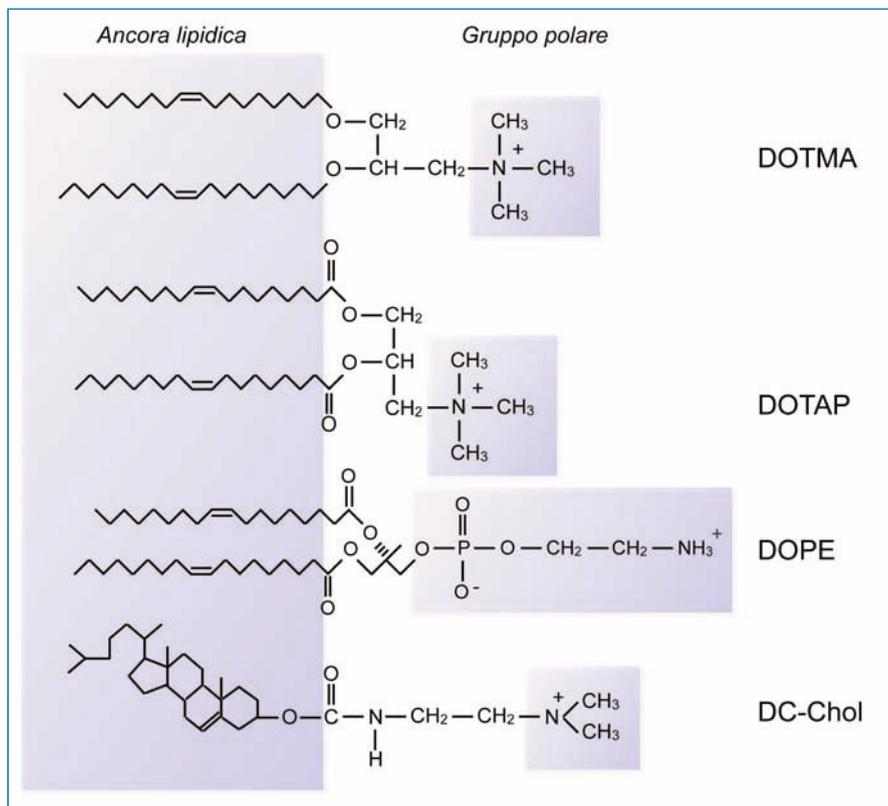
I liposomi sono delle vescicole chiuse formate da uno o più doppi strati di lipidi che racchiudono al loro centro un compartimento acquoso; una variante dei liposomi sono le micelle, costituite da sfere lipidiche senza compartimento acquoso all'interno. I liposomi sono stati originariamente sviluppati a partire dagli anni '60, e vengono oggi impiegati estesamente quali vettori di molecole per varie applicazioni, che comprendono la chemioterapia (ad esempio, il trasporto di farmaci antiblastici o antifungini per prevenirne una loro citotossicità diffusa), la diagnostica per immagini e la cosmesi. I primi liposomi sviluppati erano basati sui fosfolipidi che formano le membrane biologiche: queste molecole, infatti, presentano una testa polare e una coda lipofila costituita da acidi grassi,

e hanno quindi caratteristiche anfipatiche (o anfifiliche): una volta disperse in soluzione acquosa, tendono ad assumere spontaneamente una formazione a doppio strato (*bilayer*), formando dei foglietti che poi tendono a chiudersi in formazioni vescicolari con un nucleo acquoso centrale. Se la formazione dei liposomi avviene in una soluzione contenente un farmaco, questo si viene a trovare nel nucleo del liposoma. Una volta a contatto con la cellula, i liposomi possono fondersi direttamente con la membrana cellulare, liberando il proprio contenuto nel citoplasma, o possono essere internalizzati mediante endocitosi.

Le proprietà dei liposomi sono definite da quelle dei lipidi anfifilici che li compongono; a seconda delle caratteristiche dei gruppi della testa polare di questi ultimi si distinguono liposomi anionici, cationici, zwitterionici e non-ionici. I liposomi convenzionali, non-ionici o neutri, si complessano in maniera inefficiente con un polianione di grandi dimensioni come il DNA, e risultano quindi scarsamente efficaci nel trasferimento genico nelle cellule. Al contrario il legame con il DNA si instaura in maniera molto efficace utilizzando lipidi cationici. La Figura 3.2 mostra la struttura di due dei lipidi cationici più comuni, il DOTMA (il primo ad essere utilizzato nel 1987) e il DOTAP. Entrambi sono costituiti da due catene aciliche legate al gruppo propil-ammonio carico positivamente, rispettivamente mediante un legame eterico ed esterico. La porzione positiva del lipide cationico si complessa ad alta efficienza con il DNA, carico negativamente, e determina la sua condensazione. Il complesso DNA-lipide cationico prende il nome di *lipoplex*.

Negli ultimi anni sono state formulate una vasta serie di altri lipidi cationici, che differiscono nella porzione idrofobica della molecole, nella quantità di cariche positive o nei gruppi chimici che mediano il legame tra la porzione polare e quella idrofobica. La Figura 3.2 mostra la struttura di uno di questi lipidi, il DC-Chol, utilizzato in diverse applicazioni di terapia genica, tra cui alcune per la fibrosi cistica, in cui la porzione idrofobica consiste di uno scheletro di steroli. In generale, si è osservato che la massima efficienza di trasferimento genico viene ottenuta quando un lipide cationico viene mescolato ad un lipide zwitterionico (ovvero recante una carica complessiva neutra, pur portando cariche negative o positive su atomi diversi) quale la dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), o al colesterolo. Questi co-lipidi, quando vengono a far parte del complesso lipide cationico-DNA, hanno la funzione di facilitare la fusione o la destabilizzazione delle membrane cellulari, facilitando quindi la trasfezione. Di fatto, la miscela DOTMA/DOPE rappresenta una delle formulazioni lipidiche commerciali che tuttora hanno più successo per il trasferimento genico nelle cellule. Dopo l'interazione con la membrana plasmatica, il *lipoplex* può essere internalizzato attraverso due diverse vie, ovvero mediante fusione diretta con la membrana seguita dal rilascio del DNA nel citoplasma, oppure mediante un processo di endocitosi dipendente dalla formazione di vescicole rivestite di clatrina. La maggior parte degli studi indica che è il secondo processo quello prevalentemente responsabile dell'internalizzazione del DNA.

Una volta penetrato nella cellula all'interno delle vescicole di endocitosi, il DNA deve fuoriuscire da queste ed essere trasportato nel nucleo. Nonostante i



**Fig. 3.2.** Lipidi cationici. La figura mostra la struttura chimica di quattro lipidi comunemente utilizzati per il trasferimento genico

continui progressi compiuti nello sviluppo di *lipoplex* sempre più efficaci, questo processo ha un'efficienza ancora limitata: il numero di copie di DNA che effettivamente giungono al nucleo è soltanto una piccola frazione (dell'ordine di  $1:10^4$ - $10^5$ ) di tutte quelle che penetrano nella cellula; la maggior parte dei complessi DNA-lipide internalizzati rimangono invece intrappolati negli endosomi e sono successivamente degradati nel compartimento lisosomale.

### Polimeri cationici

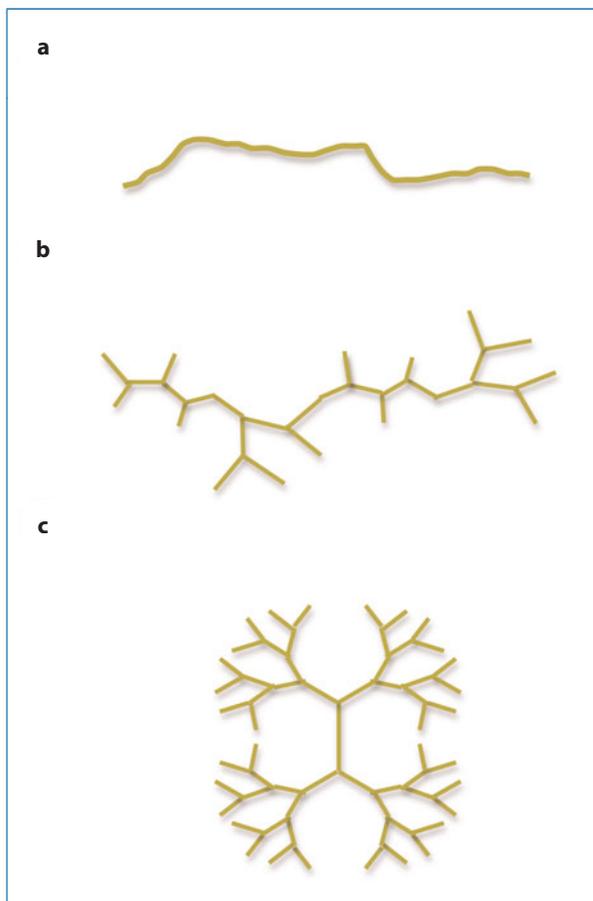
Una classe di molecole che ha la proprietà di legarsi al DNA e favorirne l'ingresso all'interno della cellula è costituita dai polimeri cationici. Esempi di queste molecole sono la poli-(L-lisina), la poli-(L-ornitina), la poli-etilenimina (PEI) lineare o ramificata, il dietilaminoetildestrano (DEAE-D), i dendrimeri di poli-(amidoamina) e il poli-(demetil-aminoetil-metacrilato o poli-(DMAEMA)).

Questi polimeri, che possono quindi assumere configurazioni lineari, ramificate o dendrimeriche (Fig. 3.3), usualmente portano un gruppo amminico protonabile, la cui carica positiva media il legame della molecola con il DNA e il compatto di quest'ultimo, consentendo quindi l'entrata del complesso DNA/polimero nella cellula mediante un processo di endocitosi. Una volta arrivato negli endosomi, si ritiene che i gruppi amminici del polimero cationico esercitino un ulteriore effetto di "spugna protonica", secondo il quale il pH dell'ambiente endosomale determina l'entrata nella vescicola di ioni cloruro, con la conseguente rottura dell'endosoma per effetto osmotico e la liberazione del DNA nel citosol. Il complesso DNA/polimero cationico è definito *polyplex*.

Uno dei principali problemi legati all'utilizzo dei polimeri cationici per il trasferimento del DNA è legato alla loro tossicità, dovuta alla carica del polimero ed alle grandi dimensioni dei complessi polimero-DNA che si vengono a formare. Per questo motivo, diversi laboratori stanno cercando di migliorare l'architettura dei polimeri e le loro proprietà biofisiche. Una classe di polimeri interessanti in questo senso è quella rappresentata dai polimeri a blocchi anfipatici, ovvero costituiti da un'alternanza di blocchi costituiti ciascuno da un omopolimero semplice idrofobico e un omopolimero semplice idrofilico. Una siffatta molecola ha la caratteristica di interagire, simultaneamente, con il DNA tramite la sua porzione idrofilica e con la membrana plasmatica della cellula tramite la sua porzione idrofobica, e risulta relativamente meno tossica per la cellula dei polimeri cationici. Altri polimeri interessanti per la loro bassa tossicità ed alta biocompatibilità sono quelli biodegradabili. Un esempio di questi è il poli-[acido  $\alpha$ -(4-amminobutil)-L-glicolico] (PAGA), un derivato della poli-(L-lisina), che si complessa con il DNA e successivamente lo rilascia quando il polimero viene idrolizzato.

Un ulteriore tipo di polimeri con caratteristiche molto attraenti per le applicazioni di terapia genica è costituito dai cosiddetti "polimeri intelligenti", "intelligenti" in quanto capaci di andare incontro ad ampie variazioni, spesso discontinue, nelle proprie caratteristiche chimiche e fisiche in risposta a stimoli ambientali quali il pH, la temperatura, la forza ionica o in presenza di campi elettrici o magnetici. Il cambiamento del polimero può consistere in una modificazione della dimensione, della struttura tridimensionale, della reattività con altre molecole. Un tipico esempio di polimero intelligente è rappresentato dai co-polimeri formati dal metilmetacrilato (MMA) con il dimetilaminoetil-metacrilato (DMAEMA). L'MMA ha caratteristiche idrofobiche mentre il DMAEMA è idrofilico; il polimero che si viene a formare presenta blocchi alternati idrofobici-idrofilici, di cui è peraltro prevalente la parte idrofilica. Il DMAEMA, tuttavia, diventa più idrofilico quando il pH della soluzione scende, mentre assume caratteristiche idrofobiche a pH più elevato, determinando quindi la precipitazione del co-polimero.

Infine, una particolare classe di polimeri è rappresentata dai dendrimeri (dal greco "dendron", albero), costituiti da una molecola centrale che funge da radice per la progressiva sintesi di un grande numero di braccia ramificate, strutturate in maniera ordinata e simmetrica (Fig. 3.3c). Analogamente ai polimeri cationici,



**Fig. 3.3.** Polimeri cationici. **a** Polimero lineare; **b** polimero ramificato; **c** dendrimero

i dendrimeri hanno la capacità di complessarsi efficientemente con il DNA e di mediarne prima l'internalizzazione nelle cellule tramite endocitosi e poi il rilascio dall'endosoma con un meccanismo di rigonfiamento osmotico. I dendrimeri sono potenzialmente utilizzabili per il trasferimento di larghi tratti di DNA (diverse decine di megabasi), e mostrano, in alcuni sistemi per ora sperimentali, un'efficienza di trasferimento genico superiore a quella dei polimeri lineari.

## Proteine

L'efficienza dei virus nel veicolare i propri acidi nucleici all'interno delle cellule è dovuta alla presenza, nelle particelle virali, di specifiche proteine. Queste, infatti, sono in grado di mediare una serie di funzioni essenziali, quali il compattamento degli acidi nucleici virali e la loro protezione contro le nucleasi extracellulari,

il legame a recettori di superficie, la fusione del pericapside del virus con la membrana cellulare, la distruzione degli endosomi - qualora l'internalizzazione avvenga per endocitosi - e, infine, il trasporto al nucleo del DNA o dell'RNA virali. Alcuni di questi processi possono essere mimati utilizzando proteine specifiche, o domini da esse derivati, nel contesto dei metodi non-virali di trasfezione.

Alcune proteine basiche, quali il polipeptide poli-cationico protamina o gli istoni, sono in grado di legarsi con alta affinità al DNA carico negativamente, determinandone il compattamento e prevenendone la degradazione. Queste molecole hanno anche la caratteristica di interagire con i proteoglicani contenenti eparan-solfati (*heparan sulfate proteoglycans*, HSPG) della superficie cellulare, delle molecole cariche negativamente che vengono espresse sulla membrana della maggior parte delle cellule, dove vanno incontro a un continuo processo di endocitosi. Grazie all'interazione con gli HSPG, i complessi proteina basica/DNA vengono direttamente internalizzati dalla cellula. Dal momento che l'efficienza di questo processo è relativamente modesta, le medesime proteine possono essere utilizzate in combinazione con liposomi o polimeri cationici.

Un particolare tipo di proteina in grado di mediare l'internalizzazione di varie macromolecole grazie alla sua interazione con gli HSPG della superficie cellulare è la proteina Tat di HIV-1. Questo fattore, che funge da potente attivatore dell'espressione genica del virus, possiede un dominio basico di 9 amminoacidi che, quando fuso a proteine eterologhe, nanoparticelle sintetiche, o piccoli acidi nucleici (ad esempio, siRNA), è in grado di mediarne l'endocitosi attraverso una via che coinvolge le vescicole che contengono la proteina caveolina (endocitosi caveolare).

Come discusso sopra, anche l'internalizzazione dei complessi lipidi cationici/DNA avviene soprattutto attraverso un processo di endocitosi, prevalentemente mediato dalle vescicole ricoperte di clatrina. È possibile quindi associare ai *lipoplex* proteine di varia derivazione, in grado di riconoscere specifici recettori coinvolti nel processo di endocitosi. Lo scopo di questo approccio è da un lato quello di aumentare l'efficienza con cui l'endocitosi avviene e dall'altro quello di indirizzare la trasfezione verso determinati tipi cellulari o tessuti. Le proteine utilizzate comprendono varie lectine (proteine molto diffuse in natura, con la capacità di legare la porzione glicidica di diverse glicoproteine e glicolipidi), le asialoglicoproteine (ovvero le glicoproteine private della porzione di acido sialico, che legano in maniera specifica un recettore espresso sulla superficie degli epatociti, detto ASGP-R, il quale riconosce le glicoproteine che portano un galattosio alla loro estremità, rimuovendole dalla circolazione tramite endocitosi e destinandole alla degradazione lisosomale), i ligandi delle integrine (ad esempio, peptidi che portano la sequenza amminoacidica Arg-Gly-Asp - RGD -), i peptidi derivati dalla apolipoproteina E (che legano il recettore delle lipoproteine a bassa densità - LDL - espresso dagli epatociti), e la transferrina (che lega il recettore per la transferrina, espresso da molti tipi cellulari). L'indirizzamento di liposomi o polimeri cationici su specifici recettori cellulari può essere ottenuto anche mediante l'inclusione, nel complesso, di anticorpi monoclonali o anticorpi a singolo filamento (scFv; vedi sezione sugli

Anticorpi e anticorpi intracellulari).

Va tuttavia ricordato che non necessariamente il legame ad un recettore cellulare che viene endocitato si traduce in un parallelo aumento dell'efficienza di trasfezione: questa, infatti, dipende non soltanto dall'internalizzazione ma anche, e soprattutto, dall'efficienza con cui il DNA è in grado di fuoriuscire dall'endosoma e di arrivare al nucleo. A questo scopo possono essere utilizzati peptidi con funzione fusogena, ovvero in grado di facilitare la destabilizzazione degli endosomi e quindi il rilascio del DNA nel citoplasma. Esempi di tali peptidi sono quelli che derivano dall'enzima emoagglutinina del virus dell'influenza o un peptide sintetico, sensibile al pH, chiamato GALA. Un'ulteriore possibilità di facilitare il processo di endosomolisi è quello di utilizzare l'emoagglutinina del virus di Sendai (un paramixovirus anche chiamato *hemoagglutinating virus of Japan*, HVJ), una proteina dotata di capacità fusogena, o virioni interi di adenovirus inattivati mediante irradiazione con raggi UV, sfruttando, in quest'ultimo caso, la naturale proprietà endosomolitica delle proteine del capsido di questo virus.

Altri peptidi possono invece facilitare il passaggio successivo, ovvero il trasporto del DNA dal citoplasma al nucleo. In particolare, sono stati utilizzati peptidi che portano un segnale di riconoscimento nucleare (*nuclear localization signal*, NLS), ovvero la corta sequenza di amminoacidi basici riconosciuta dalle importine, proteine che mediano il trasporto dal citoplasma al nucleo delle proteine che contengono questa sequenza.

### Problematiche legate all'utilizzo dei metodi chimici per il trasferimento genico

Nonostante i metodi chimici di trasferimento genico presentino notevoli vantaggi in termini di produzione, maneggevolezza e sicurezza quando paragonati ai vettori virali, e a dispetto dell'enorme mole di ricerca dedicata al loro miglioramento negli ultimi 20 anni, l'efficienza complessiva di questi sistemi rimane ancora insoddisfacente. A livello cellulare, l'internalizzazione di liposomi cationici, proteine o polimeri cationici avviene prevalentemente per endocitosi, e la quantità di DNA o RNA che riesce a raggiungere il nucleo costituisce soltanto una piccola frazione di quella internalizzata dalla cellula, di cui la maggior parte rimane intrappolata negli endosomi e viene successivamente distrutta nei lisosomi. Nel caso dei plasmidi, il DNA che giunge nel nucleo, mancando di sistemi di protezione dalla degradazione da parte delle nucleasi cellulari e non essendo capace di integrarsi nel genoma cellulare se non in maniera sporadica, viene progressivamente perduto nel tempo, consentendo quindi l'espressione del trasgene veicolato per periodi solitamente non superiori ad un paio di settimane.

Quando i complessi non-virali vengano somministrati per via sistemica, insorgono problemi addizionali dovuti alla difficoltà che essi mostrano a raggiungere i tessuti bersaglio e ad una loro rapida eliminazione mediata dalle cellule del sistema reticolo-endoteliale. Il modo più comune per evitare le interazioni aspecifiche, analogamente a quando utilizzato per molti altri farmaci, è quella di mascherare le cariche dei *lipoplex* o dei *polyplex* con polimeri idrofilici neutri,

quali il glicole polietilenico (*polyethylene glycol*, PEG). Oltre a diminuire le interazioni aspecifiche con le cellule, la cosiddetta “PEGilazione” previene anche l’aggregazione, favorendo la formazione di complessi più piccoli - il che di solito è un vantaggio per il trasferimento genico - e previene l’interazione dei complessi con le proteine del siero e con altre componenti extracellulari, favorendo complessivamente, quindi, la persistenza dei complessi nel circolo sanguigno.

Infine, nonostante sia ormai un dato acquisito che i sistemi non-virali di trasferimento genico causano una risposta immunitaria meno marcata dei vettori virali, i complessi formati dal DNA con lipidi cationici, proteine o polimeri sono comunque riconosciuti dai macrofagi e da altre cellule APC, in grado di attivare una risposta immunitaria sia contro le molecole utilizzate per il trasferimento genico sia contro le proteine codificate dai geni terapeutici stessi. Inoltre, i liposomi cationici risultano tossici in quanto sono in grado di indurre rapidamente la produzione di citochine proinfiammatorie, quali TNF $\alpha$ , IL6, IL12 e IFN $\gamma$ . Parte di questa risposta è anche dovuta alla presenza, nel DNA plasmidico che solitamente viene utilizzato per il trasferimento dei geni terapeutici, di sequenze CpG non metilate, sequenze che rappresentano un potente stimolo alla risposta immunitaria.

Alla luce di queste considerazioni, non stupisce che la maggior parte (circa il 70%) delle sperimentazioni cliniche di terapia genica finora condotte, e in particolare quelle che si propongono il trasferimento di geni che codificano proteine, abbiano preferito l’utilizzo di vettori virali per il trasferimento genico.

## Vettori virali

Il sistema di gran lunga più efficiente di trasferimento genico è costituito dai vettori basati sui virus che naturalmente infettano le cellule animali. Nel loro ciclo replicativo, infatti, i virus utilizzano una serie di meccanismi molecolari molto efficaci per far penetrare nella cellula il proprio genoma, meccanismi che sono stati selezionati durante milioni di anni di storia evolutiva. Nella sua accezione più semplice, una particella virale può di fatto essere considerata semplicemente composta da un acido nucleico e da una serie di proteine che ne impediscono la degradazione nell’ambiente extracellulare e ne mediano, appunto, l’internalizzazione e il trasporto all’interno della cellula bersaglio.

I diversi vettori virali sono costituiti sulla base di principi comuni: 1) la rimozione, dal genoma virale, della maggior parte dei geni che codificano proteine virali e, in particolare, di quelli potenzialmente patogeni per la cellula; 2) il mantenimento, nel genoma virale, delle sequenze *in cis* indispensabili per la replicazione del virus e, in particolare, di quelle che determinano l’inclusione del genoma del virus nelle particelle virali (segnale di incapsidamento,  $\psi$ ); 3) l’espressione dei geni virali indispensabili per la replicazione del virus da parte di plasmidi trasfettati transitoriamente o integrati nel genoma delle cellule produttrici o prodotti da un virus con funzione *helper*.

Cinque classi di vettori sono attualmente in fase avanzata di sperimentazione

per la terapia genica nell'uomo. Questi comprendono due membri della famiglia dei *Retroviridae* (gammaretrovirus e lentivirus), gli adenovirus, il virus adeno-associato (AAV) e gli herpesvirus. Altri virus, quali i vacciniavirus, i virus appartenenti ai generi spumavirus e alfaretrovirus della famiglia dei retrovirus, e virus a RNA quali il Semliki Forest Virus, sono anch'essi presi in considerazione per il trasferimento di geni a scopo terapeutico, ma il loro utilizzo è limitato a fini vaccinali (vacciniavirus) o necessitano ancora di esteso sviluppo e sperimentazione pre-clinica.

Le modalità di produzione e le caratteristiche delle cinque principali classi di vettori virali sono presentate di seguito.

### Vettori basati sui gammaretrovirus

La grande maggioranza delle sperimentazioni cliniche condotte negli anni '90 ha sfruttato le proprietà dei vettori basati sui gammaretrovirus. Questi vettori sono stati privilegiati per la loro relativa semplicità genetica, perché possono infettare con alta efficienza una vasta gamma di tipi cellulari, e perché il loro ciclo biologico contempla una forma di DNA provirale che si integra in maniera stabile nel genoma della cellula ospite, rendendo quindi permanente la modificazione genetica introdotta nella cellula.

### Biologia molecolare e ciclo replicativo dei retrovirus

La famiglia dei *Retroviridae* comprende una vasta serie di virus con il genoma a RNA, dotati di pericapside (*envelope*) ed aventi una comune struttura e il medesimo ciclo replicativo. La caratteristica peculiare dei membri di questa famiglia è quella di codificare un enzima, la trascrittasi inversa (*reverse transcriptase*, RT), in grado di copiare il genoma a RNA del virus in una forma a cDNA a doppio filamento che, grazie a un altro enzima virale, l'integrasi (IN), si integra nel DNA della cellula infettata; il genoma virale integrato prende il nome di provirus.

### Classificazione

I membri della famiglia dei retrovirus possono essere variamente classificati a seconda delle caratteristiche morfologiche, dello spettro d'ospite (retrovirus murini, aviari, felini, bovini, umani, etc.), del tipo di malattia causata (retrovirus della leucemia, sarcoma, mieloblastosi, immunodeficienza, etc.). Più recentemente, la classificazione tassonomica è stata modificata al fine di considerare sia i parametri precedentemente utilizzati sia le informazioni disponibili sull'organizzazione del genoma. La famiglia dei *Retroviridae* oggi comprende 2 sottofamiglie (*Orthoretrovirinae* e *Spumaretrovirinae*) e 7 generi: alpharetrovirus (la cui specie prototipo è rappresentata dai virus della leucosi aviaria, *avian leukosis virus*, ALV), betaretrovirus (virus del tumore mammario del topo, *mouse mammary tumour virus*, MMTV), gammaretrovirus (virus della leucemia murina, *murine*

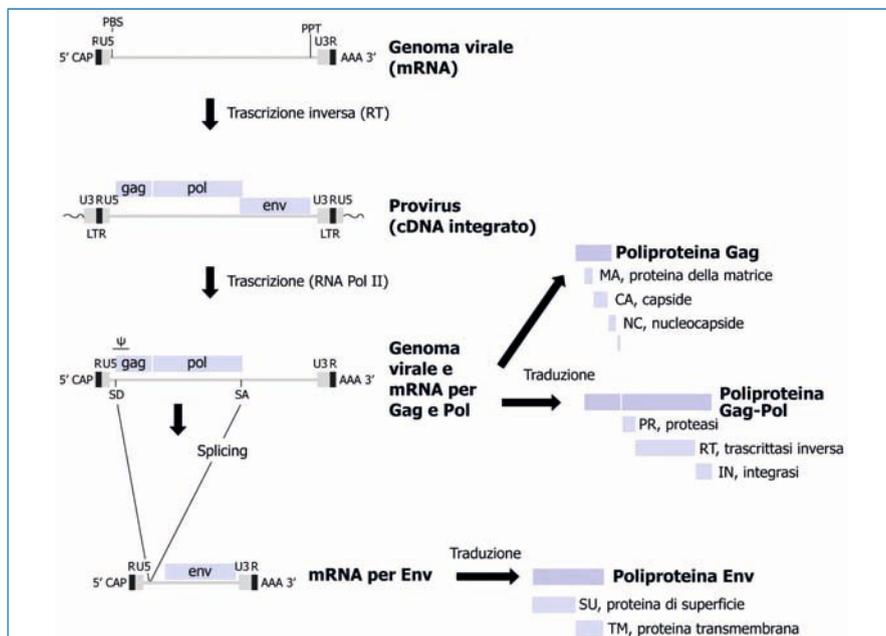
*leukemia virus*, MLV), deltaretrovirus (virus della leucemia bovina, *bovine leukemia virus*, BLV), epsilonretrovirus (virus del sarcoma del derma di Walleye, *Walleye dermal sarcoma virus*, WDSV), lentivirus (virus dell'immunodeficienza umana, *human immunodeficiency virus type 1*, HIV-1) e spumavirus (spumavirus umano, *human foamy virus*, HFV).

Una classificazione che continua ad essere utile a scopo operativo (specialmente nel contesto della terapia genica) è quella che suddivide la famiglia dei retrovirus in tre sottogruppi maggiori: oncoretrovirus (che comprende i primi 5 generi, capaci di indurre tumori in varie specie di mammiferi e uccelli), lentivirus (che causano malattie caratterizzate da un lungo periodo di incubazione e lenta evoluzione) e spumavirus (che inducono, nelle cellule di scimmia, un effetto citopatico caratterizzato dalla formazione di grandi vacuoli). Alla luce della loro organizzazione genetica, i retrovirus appartenenti ai secondi due gruppi sono anche definiti retrovirus complessi.

### **Organizzazione del genoma e proteine virali**

Il provirus ha una lunghezza di 9-11 kb; alle sue estremità 3' e 5' sono presenti due sequenze identiche di circa 400-700 nucleotidi, denominate ripetizioni terminali lunghe (*long terminal repeat*, LTR) (Fig. 3.4). Ciascuna delle LTR è composta da tre regioni, denominate U3, R e U5. La regione U3 dell'LTR all'estremità 5' contiene il promotore del virus: la trascrizione inizia a livello del primo nucleotide della regione R e procede per l'intero genoma fino a giungere alla regione U5 dell'LTR al 3' del provirus, che contiene un segnale di poliadenilazione. L'RNA trascritto da un lato funge da pre-mRNA per la traduzione di tutte le proteine virali e dall'altro costituisce il genoma virale che viene incapsidato nel virione. A differenza del provirus, quindi, che è fiancheggiato dalle due LTR complete, il genoma virale ad RNA inizia con la regione R-U5 all'estremità 5' e termina con la regione U3-R all'estremità 3'. La struttura completa del LTR si viene a formare durante il processo di trascrizione inversa.

Tra le due LTR sono presenti tre geni essenziali per la replicazione del virus, i geni *gag*, *pol* ed *env* (Fig. 3.4). Il gene *gag* codifica le proteine del virus che si associano al genoma virale e sono indispensabili per l'assemblaggio del virione; esse comprendono la proteina del capsido (CA), del nucleocapsido (NC), della matrice (MA). Il gene *pol* codifica i tre enzimi che sono propri della famiglia dei Retrovirus, ovvero la trascrittasi inversa (RT), la proteasi (PR) e l'integrasi (IN). La RT è responsabile del processo di trascrizione inversa del genoma virale a RNA in una forma a cDNA; la PR media il taglio delle poli-proteine che si formano durante la traduzione degli mRNA virali per costituire le singole proteine del virus; l'IN è l'enzima che determina l'integrazione del cDNA virale nel genoma della cellula ospite. Il gene *env* codifica le proteine che si vengono a trovare sull'*envelope* dei virioni e mediano il legame con i recettori della cellula da infettare. Queste sono la proteina TM, che si localizza in posizione trans-membrana prima sulla cellula infettata e poi, quando il virus gemma fuori da essa, sull'*envelope* del virione, e la proteina SU, che rimane ancorata sulla superficie esterna di TM e media il riconoscimento dei recettori cellulari.

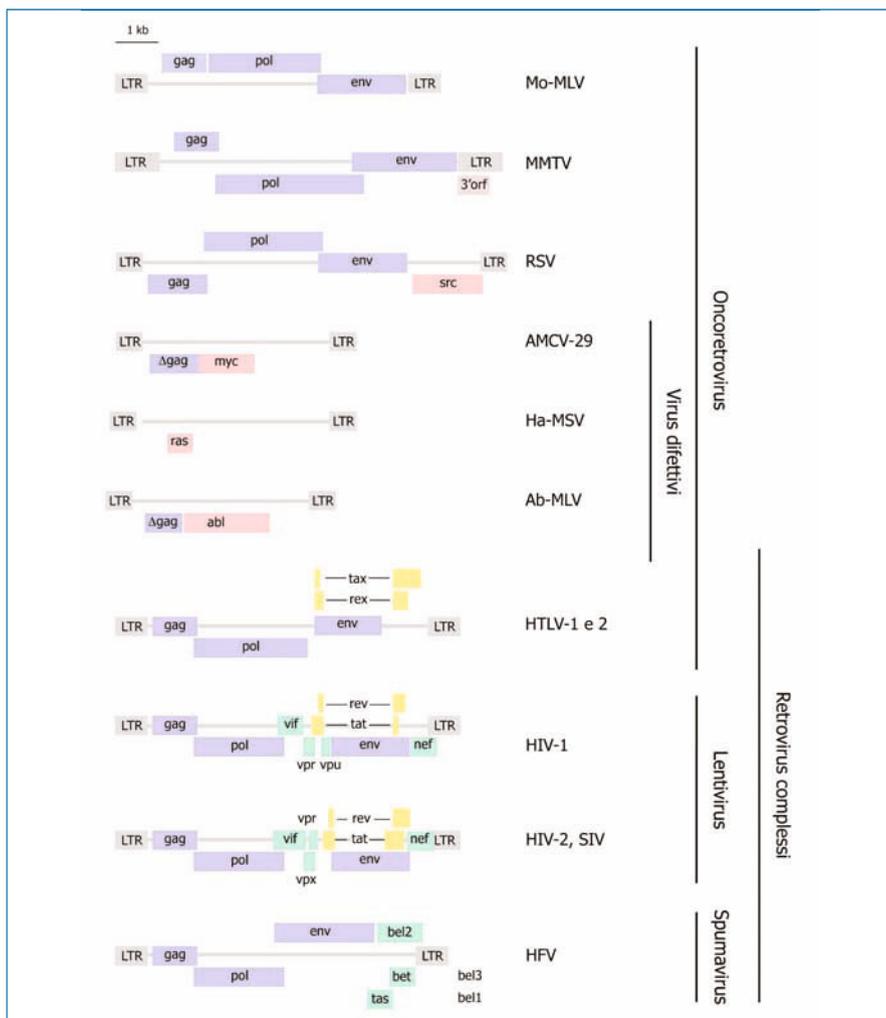


**Fig. 3.4.** Genoma retrovirale e proteine da esso codificate. La figura mostra (*dall'alto verso il basso*) la struttura del mRNA genomico di un gammaretrovirus tipico, del DNA provirale da esso ottenuto grazie alla trascrizione inversa, e dei due principali trascritti (mRNA genomico di lunghezza completa e mRNA da esso derivato grazie a un evento di *splicing*). Le proteine codificate dai due trascritti virali sono indicate nella parte destra della figura

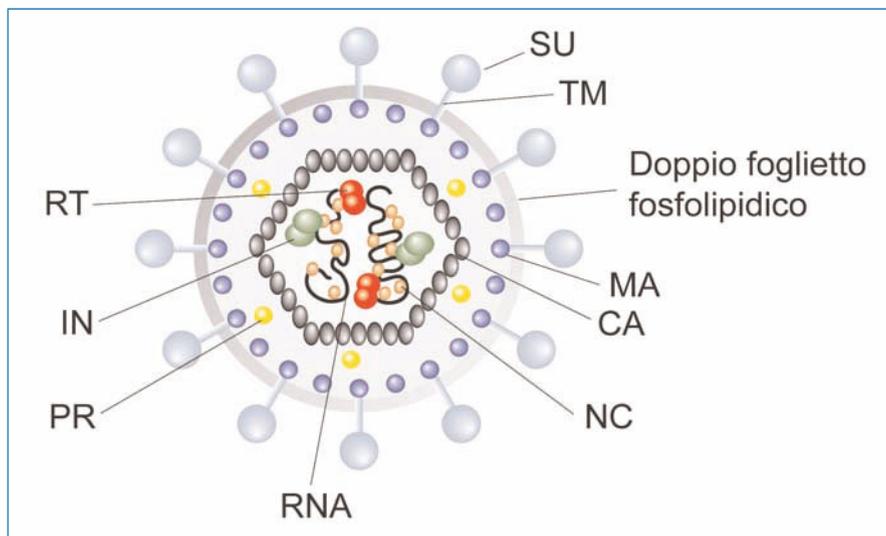
La presenza delle LTR e la funzione dei geni *gag*, *pol* ed *env* è comune a tutti i retrovirus ed è indispensabile per la loro replicazione. Alcuni membri della famiglia, tuttavia, presentano alcune variazioni della struttura genetica generale. In particolare, i retrovirus complessi (tra cui HTLV-1, tutti i lentivirus e gli spumavirus), in aggiunta a *gag*, *pol* ed *env*, presentano una serie di geni addizionali, codificati nella metà al 3' del genoma (Fig. 3.5). Questi geni, anche definiti "geni accessori" sono fondamentali per una serie di funzioni. Ad esempio, HIV-1 contiene 6 geni accessori (*tat*, *rev*, *nef*, *vpr*, *vpu* e *vpr*) che sono coinvolti in vari aspetti del ciclo replicativo.

Infine, diversi gammaretrovirus e alfaretrovirus contengono un gene aggiuntivo, di derivazione cellulare. Si tratta di un oncogene, ovvero della versione attivata di un gene normalmente espresso dalla cellula e deputato al controllo del ciclo cellulare o del differenziamento. Le versioni virali (oncogeni, *v-onc*) di questi geni cellulari normali (proto-oncogeni, *c-onc*) sono prive di introni (quindi simili ai cDNA dei geni cellulari) e sono attive in maniera costitutiva, in quanto contengono mutazioni che attivano la proteina codificata o sono trascritti in maniera continua e ad alti livelli. Esempi di oncogeni sono *src* (nel virus del sarcoma di Rous, RSV), *myb* (virus della mieloblastosi aviaria (AMV),

*abl* (virus della leucemia murina di Abelson, Ab-MLV), ecc. I virus che portano un oncogene hanno la capacità di trasformare le cellule che infettano molto rapidamente, in quanto l'oncogene costitutivamente attivato che portano determina la continua permanenza della cellula nel ciclo cellulare. Il virus del sarcoma di Rous (RSV) è l'unico retrovirus in cui il *v-*onc** si aggiunge a geni *gag*, *pol* ed *env* intatti (Fig. 3.5). In tutti gli altri casi, i retrovirus che contengono un oncogene mostrano delezioni più o meno estese in questi geni, che vengono forniti *in trans* mediante co-infezione della stessa cellula da parte di un virus *helper* che li codifica.



**Fig. 3.5.** Genomi retrovirali. La figura illustra l'organizzazione genetica di alcuni retrovirus, indicando i geni comuni a tutti i retrovirus (in colore lilla) e i geni specifici di ciascun virus (gli altri colori)



**Fig. 3.6.** Virione di un retrovirus. La figura mostra il prototipo di un virione di retrovirus, indicando le proteine contenute al suo interno e sulla sua superficie. *SU*, proteina della superficie; *TM*, proteina transmembrana; *MA*, proteina della matrice; *CA*, proteina del capsid; *NC*, proteina del nucleocapsid; *PR*, proteasi; *IN*, integrasi; *RT*, trascrittasi inversa

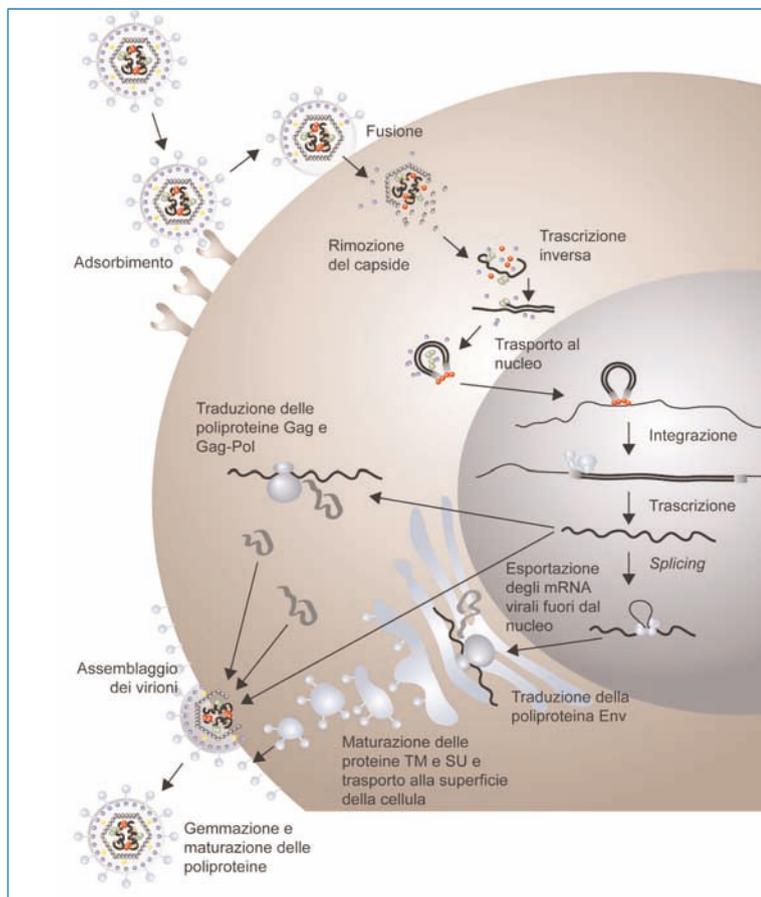
Anche diversi retrovirus che non contengono un oncogene ma che sono in grado di replicarsi autonomamente – tra cui il virus della leucemia di Moloney (Mo-MLV), utilizzato per costruire la maggior parte dei vettori per la terapia genica - sono in grado di trasformare le cellule che infettano. Tuttavia, questo processo richiede molte settimane o mesi. Nel caso di Mo-MLV, la trasformazione è dovuta ad un evento di mutagenesi inserzionale, ovvero all'attivazione di un proto-oncogene o alla disattivazione di un gene onco-soppressore della cellula, dovute all'integrazione del provirus in corrispondenza di questi geni.

### Struttura dei virioni

I virioni che gemmano dalle cellule infettate da un retrovirus hanno un diametro di 80-100 nm e sono circondati da un *envelope*, costituito dalla membrana a doppio strato fosfolipidico della cellula, che espone sulla superficie esterna le proteine virali glicosilate *TM* e *SU*, mantenute insieme da ponti disolfuro. All'interno del virione sono presenti le proteine *MA*, *CA* e *NC* che si associano a due copie identiche del genoma virale. All'interno del virione sono anche presenti gli enzimi del virus (*RT*, *PR* e *IN*; Fig. 3.6).

### Ciclo replicativo

Il ciclo replicativo dei retrovirus, riassunto schematicamente nella Figura 3.7, può essere suddiviso in una serie di passaggi successivi. L'adsorbimento del virione alla superficie della cellula è mediato dall'interazione di *SU* con una proteina



**Fig. 3.7.** Ciclo replicativo di un retrovirus. Sono indicati i principali passaggi nel processo di replicazione dei retrovirus (vedi il testo per la descrizione)

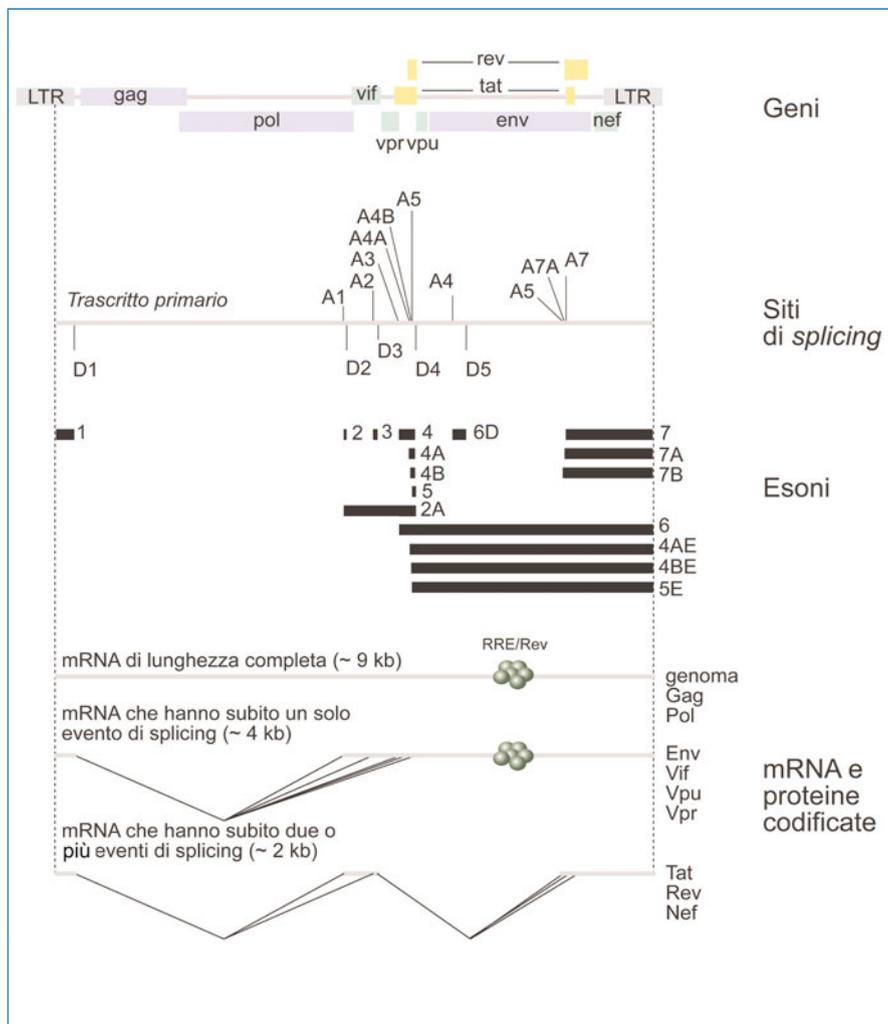
presente sulla membrana plasmatica, che funge da recettore. I diversi membri della famiglia dei retrovirus hanno sviluppato proteine SU in grado di legarsi a diversi recettori, di cui alcuni esempi sono riportati nella Tabella 3.2. L'internalizzazione è attivata da un cambiamento di conformazione della proteina TM, che determina la fusione tra l'*envelope* del virione e la membrana della cellula. In seguito a questo evento, il contenuto del virione si viene a ritrovare nel citosol della cellula, dove inizia la rimozione del nucleocapside. Sempre nel citosol, l'enzima trascrittasi inversa (RT) catalizza la trascrizione inversa dell'RNA virale. Questo processo è innescato dall'appaiamento di un tRNA cellulare (diverso per ogni tipo di retrovirus) a una specifica sequenza complementare, posta immediatamente a valle del LTR al 5' del genoma, denominata *primer binding site* (PBS). La RT si comporta da DNA polimerasi RNA-dipendente, sintetizzando

**Tabella 3.2.** Esempi di proteine cellulari di membrana che fungono da recettori per diversi retrovirus

Retrovirus	Acronimo	Recettore	Funzione
Virus della leucemia di Moloney – ecotropico	Mo-MLV eco	Rec-1 (mCAT-1)	Trasportatore di amminoacidi basici
Virus della leucemia di Moloney – anfortropico	Mo-MLV anfo	Ram-1	Trasportatore di fosfati
Virus della leucemia del gibbono	GaLV	GLVR-1	Trasportatore di fosfati
Virus della leucemia dei gatti	FeLV		
Virus del sarcoma della scimmia	SSV		
Virus del sarcoma/leucemia degli uccelli sottotipo A	ASLV-A	Tv-a	Proteina correlata al recettore delle lipoproteine a bassa densità (LDL)
Virus del sarcoma/leucemia degli uccelli sottotipo B	ASLV-B	CAR1	Proteina correlata al recettore delle lipoproteine a bassa densità (LDL)
Virus dell'immuno-deficienza umana di tipo 1	HIV-1	CD4 CXCR4 o CCR5	Recettore delle cellule T Recettore delle chemochine

una copia di cDNA a doppio filamento a partire dall'mRNA virale e, al contempo, agisce da RNasi H, eliminando la porzione di RNA dagli ibridi DNA:RNA. Il processo di trascrizione inversa, che richiede la presenza delle regioni ripetute R, porta alla formazione di LTR in corrispondenza di entrambe le estremità del genoma. Il cDNA virale neosintetizzato nel citosol fa parte di un complesso nucleoproteico che comprende, oltre a RT, anche l'integrasi (IN), diverse proteine cellulari non del tutto identificate e, nel caso dei retrovirus complessi, anche alcune altre proteine virali (ad esempio, Vpr e MA nel caso di HIV-1). Questo complesso prende il nome di complesso di pre-integrazione (*pre-integration complex*, PIC). Nei gammaretrovirus, il PIC non è in grado di oltrepassare i pori nucleari, e può quindi raggiungere il DNA della cellula ospite soltanto durante il processo di divisione cellulare dopo la disintegrazione della membrana nucleare. Al contrario, il PIC dei lentivirus contiene alcune proteine (tra cui IN, probabilmente Vpr e forse MA nel caso di HIV-1) in grado di interagire con le proteine

dei pori nucleari ed entrare nel nucleo anche nelle cellule quiescenti. Di conseguenza, i lentivirus, contrariamente ai gammaretrovirus, possono infettare sia le cellule in fase di replicazione sia quelle quiescenti. Il processo di integrazione del cDNA virale all'interno del DNA della cellula infettata è mediato dall'enzima IN con l'ausilio di diverse proteine cellulari. L'integrazione è casuale in termini di specificità di sequenza, tuttavia avviene solitamente in corrispondenza dei geni trascrizionalmente attivi della cellula. Dopo l'integrazione, il DNA provirale può essere a tutti gli effetti considerato come un gene aggiuntivo della cellula infettata, la cui trascrizione è sostenuta dalla RNA polimerasi II cellulare e coinvolge le medesime classi di fattori cellulari che controllano l'espressione dei geni cellulari. Il promotore è costituito dalla regione U3 del LTR al 5' del provirus. L'RNA polimerasi II genera un unico trascritto, che inizia nella regione R al 5' del provirus e termina nella regione U5 al 3'. Questo trascritto corrisponde al genoma virale e rappresenta allo stesso tempo l'RNA messaggero per la sintesi di tutte le proteine del virus. Dal momento che, nelle cellule eucarioti, tutti gli mRNA sono monocistronici (ovvero codificano una sola proteina), questo mRNA primario subisce una serie di eventi di processamento (*splicing*) per generare diversi mRNA più corti, ciascuno deputato alla traduzione di una singola proteina. In particolare, nelle cellule infettate dai gammaretrovirus sono riscontrabili due mRNA principali, uno corrispondente al trascritto originario, e il secondo in cui è stato rimosso un lungo introne nella metà al 5' del genoma utilizzando un sito 5' e un sito 3' di *splicing* (rispettivamente, *splice donor* - SD - e *splice acceptor* - SA -) (Fig. 3.4). Il primo trascritto viene utilizzato per la sintesi delle proteine codificate dal *gag* e *pol* sui ribosomi nel citosol, mentre il secondo codifica le proteine di *env* sui ribosomi associati al reticolo endoplasmico. Nel caso dei deltaretrovirus (HTLV-1), lentivirus (HIV-1) e spumavirus, la situazione è più complessa, dal momento che questi virus codificano una serie aggiuntiva di proteine accessorie, per ciascuna delle quali è richiesto almeno un mRNA specifico. Questi mRNA più corti sono generati mediante processi di *splicing* alternativo multiplo. Per esempio, nel caso di HIV-1, più di 35 mRNA vengono generati utilizzando diversi siti 5' e 3' di *splicing*. La creazione di molteplici mRNA tramite eventi di *splicing* alternativo crea per la cellula il problema di dover esportare dal nucleo mRNA che ancora contengono introni, ovvero non processati completamente, un evento che solitamente non accade per gli mRNA cellulari. Questo problema è stato risolto evolutivamente in maniera diversa dai gammaretrovirus e dai retrovirus complessi. L'mRNA virale dei primi contiene delle sequenze (*constitutive export elements*, CTE) che promuovono la sua fuoriuscita dal nucleo legandosi a specifiche proteine cellulari. I retrovirus complessi, invece, codificano una proteina (Rev, nel caso di HIV-1) che si lega ad una sequenza di RNA nel genoma virale (*Rev responsive element*, RRE, nel caso di HIV-1) e contemporaneamente al poro nucleare, mediando quindi la traslocazione dal nucleo al citoplasma degli RNA che contengono la regione bersaglio (Fig. 3.8). Una volta fuori dal nucleo, gli mRNA per i geni *gag*, *pol* ed *env* sono tradotti per generare delle poliproteine (Gag, Gag-Pol ed Env), che a loro volta vengono tagliate per dare origine ai polipeptidi finali. La poliproteina Gag genera le proteine MA, CA, NC (più



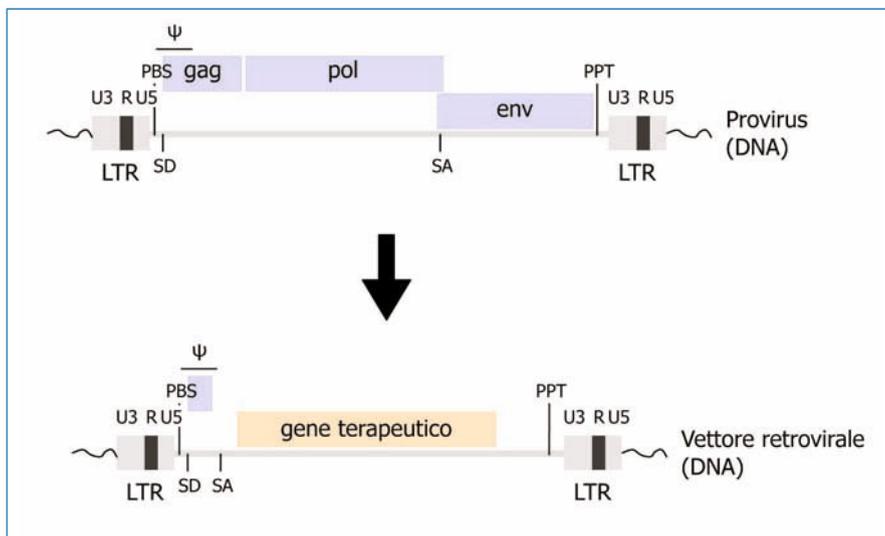
**Fig. 3.8.** Trascritti generati dal mRNA di HIV-1. La trascrizione del DNA provirale di HIV-1 genera un singolo mRNA, contenente molteplici siti di *splicing* 5' (*splice donor*, D) e 3' (*splice acceptor*, A). Questi siti definiscono diversi esoni, contenenti le regioni codificanti tutte le proteine virali. Il processo di *splicing* genera più di 25 diversi mRNA, che possono essere raggruppati in 3 classi a seconda della loro dimensione: la classe più lunga (~9 kb) comprende un solo mRNA, corrispondente al trascritto genomico completo; i trascritti di lunghezza intermedia (~4 kb) comprendono gli mRNA che hanno subito *splicing* nella regione al 5' del genoma; i trascritti più corti (~2 kb) includono gli mRNA che hanno subito due o più eventi di *splicing*. Le prime due classi di mRNA contengono la sequenza RRE, che si lega alla proteina virale Rev

qualche altro piccolo polipeptide in alcuni retrovirus); quella Gag-Pol genera gli enzimi RT, PR e IN e, infine, la poliproteina Env genera le proteine SU e TM (Fig. 3.4). Nel caso di Gag e Pol, il taglio proteolitico è operato dall'enzima virale PR; nel caso di Env, è una furin-proteasi di origine cellulare che agisce nell'apparato del Golgi durante il processo di glicosilazione della proteina, prima che questa sia esposta sulla membrana. Mentre Env è tradotta a partire da uno o più mRNA dedicati, Gag e Gag-Pol vengono solitamente tradotti dallo stesso mRNA, mediante un meccanismo di soppressione del codone di STOP del primo polipeptide (nel caso dei gammaretrovirus) o di salto della cornice di lettura tra il polipeptide a monte e quello a valle (*ribosomal frameshift*; nel caso di HIV-1). Infine, l'assemblaggio del virione è stimolato dal polipeptide Gag che, in corrispondenza della proteina NC, si lega al segnale di incapsidamento o *packaging* ( $\psi$ ), presente nell'mRNA virale. La proteina Env viene tradotta indipendentemente da Gag e Pol all'interno del reticolo endoplasmico, viene glicosilata e matura nelle proteine TM ed SU all'interno dell'apparato di Golgi che vengono quindi esposte sulla membrana cellulare. Nelle regioni in cui avviene la gemmazione dei virioni, la proteina si associa a questi in virtù del suo legame con la porzione N-terminale di Gag. Una volta uscito dalla cellula, il virione va incontro ad un processo di maturazione, per il quale le poliproteine Gag e Gag-Pol vengono processate. Il taglio proteolitico è mediato da PR, che per prima cosa rimuove se stessa da Gag.

### Struttura dei vettori basati sui gammaretrovirus

Il prototipo dei gammaretrovirus usati per la terapia genica è il virus della leucemia di Moloney (Mo-MLV), il cui genoma integrato comprende, oltre ai tre geni essenziali *gag*, *pol* ed *env*, i seguenti elementi genetici, elencati dal 5' al 3' (Fig. 3.9):

1. le LTR virali, di cui la regione U3 (al 5') rappresenta il promotore per la trascrizione, la regione R è richiesta per la trascrizione inversa e la regione U5 (al 3') contiene il segnale di poliadenilazione del messaggero ed è la prima regione che viene copiata durante il processo di trascrizione inversa;
2. il sito di riconoscimento del *primer* (PBS), posizionato immediatamente a valle della LTR al 5', che rappresenta la regione in cui si appaia il tRNA cellulare che innesca la trascrizione inversa;
3. i siti 5' (*splice donor*, SD) e 3' (*splice acceptor*, SA) di *splicing* che determinano il processamento dell'mRNA virale per generare il trascritto subgenomico; la regione che inizia dalla giunzione U3/R e termina a livello del sito SD è definita sequenza *leader*, comune a tutti i trascritti;
4. il segnale di incapsidamento ( $\psi$ ), che comprende una regione di RNA strutturata nella regione al 5' del gene *gag*, che si estende parzialmente anche a monte del sito SD; questa è la regione che riconosce la proteina Gag, che determina l'inclusione del genoma virale nei virioni al momento dell'assemblaggio;



**Fig. 3.9.** Rappresentazione schematica della struttura dei vettori gammaretrovirali. *Lo schema superiore* mostra gli elementi genetici che caratterizzano un gammaretrovirus (ad esempio, Mo-MLV); *lo schema inferiore* riporta la struttura di un vettore prototipo da esso derivato. *LTR*, long terminal repeat; *PBS*, primer binding site; *PPT*, poly-purine tract; *SA*, 3' splice site; *SD*, 5' splice site

- una regione ricca in purine (*polypurine tract*, PPT), posizionata all'estremità 3' del genoma, a monte del LTR, che è indispensabile nel processo di trascrizione inversa.

I vettori gammaretrovirali mantengono questi elementi genetici, mentre la maggior parte delle rimanenti porzioni del genoma vengono eliminate, comprese quelle che codificano i geni virali con l'eccezione di una piccola porzione di *gag* che contiene il segnale  $\psi$  (Fig. 3.9). Nella versione più semplice dei vettori gammaretrovirali, quindi, la trascrizione del gene terapeutico è controllata direttamente dal LTR virale.

### **Produzione dei vettori gammaretrovirali**

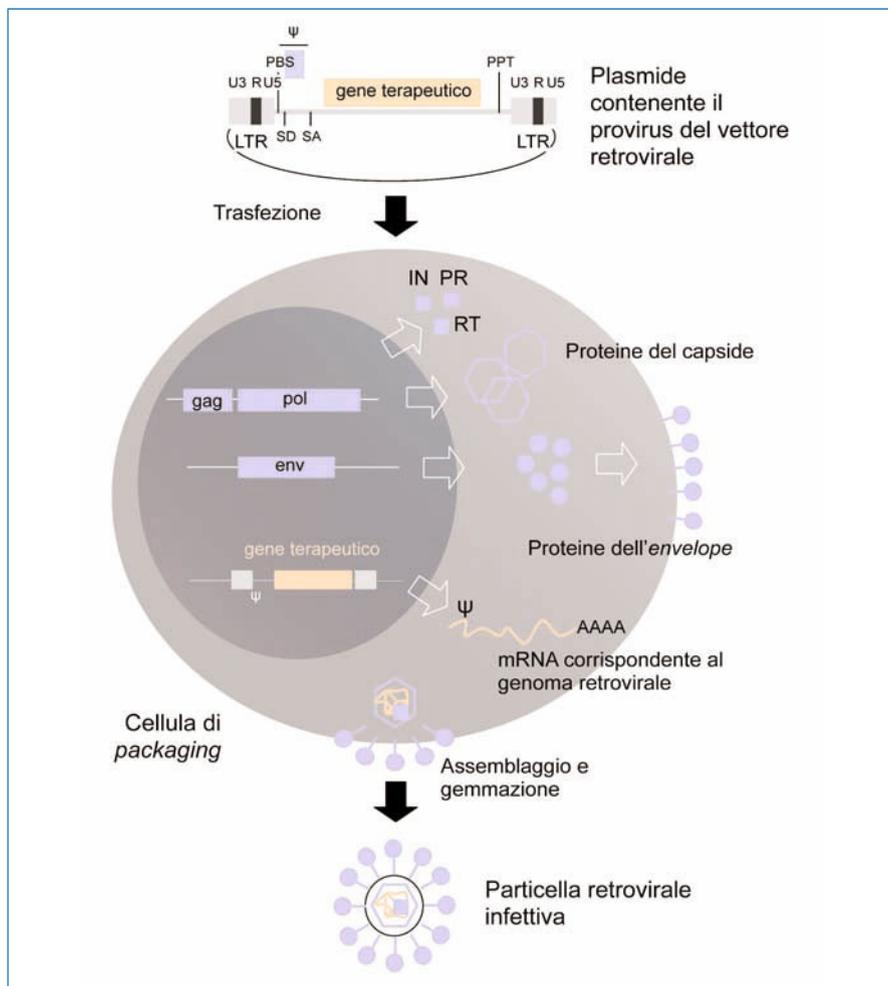
I vettori virali basati sui gammaretrovirus sono prodotti in cellule di mammifero in coltura. Viene inizialmente ottenuto, mediante tecniche standard di clonazione, un plasmide contenente il DNA provirale, avente la struttura riportata schematicamente nella Figura 3.9. Questo plasmide viene amplificato nei batteri, purificato e quindi trasfettato in una linea cellulare (linea cellulare di *packaging*), solitamente di origine murina, che consente la produzione dei virioni ricombinanti in quanto fornisce *in trans* le proteine virali indispensabili per la replicazione. Le cellule di *packaging* vengono infatti generate mediante la

trasfezione stabile dei geni Gag-Pol ed Env, e producono quindi le proteine da essi codificati. Solitamente, la trasfezione di questi due segmenti del genoma retrovirale è eseguita in tempi diversi, in modo da evitare la loro integrazione in regioni contigue nel genoma cellulare e ridurre quindi la possibilità che, grazie a eventi di ricombinazione tra questi geni e il plasmide contenente il vettore retrovirale o il genoma dei retrovirus endogeni, possa generarsi un virus infettivo (*replication competent retrovirus*, RCR), in grado di replicarsi autonomamente. Di fatto, sono sufficienti 10 paia di basi di omologia tra le sequenze di *packaging* e il vettore per consentire indesiderati eventi di ricombinazione tali da generare virus infettivi.

Quando il plasmide contenente il DNA retrovirale viene trasfettato nelle cellule di *packaging*, esso viene trascritto a partire dal LTR virale, generando quindi un mRNA che, oltre al gene terapeutico, contiene anche il segnale di incapsidamento  $\psi$  che ne media il riconoscimento da parte delle proteine codificate dal gene *gag* e quindi la sua inclusione in una nuova particella virale (Fig. 3.10). Il virione così generato è strutturalmente identico al virione di un virus *wild type*, ed è quindi in grado di infettare una nuova cellula. L'enzima RT, portato dal virione, retrotrascrive l'RNA del vettore, dal momento che questo contiene le regioni del LTR, il PBS e la regione PPT necessarie e sufficienti per la trascrizione inversa. Il cDNA così generato viene quindi integrato in maniera stabile nel genoma della cellula ospite da parte dell'enzima IN, anch'esso veicolato dal virione. Una volta integrato, il provirus del vettore genera degli mRNA che non sono più capaci di replicazione autonoma, in quanto non è presente alcuna delle proteine virali. I vettori retrovirali, quindi, sono capaci di un solo ciclo di infezione.

Nel corso dei primi dieci anni di sviluppo della terapia genica sono state ottenute molte decine di linee di *packaging* diverse, che differiscono per la provenienza dei geni *gag-pol* ed *env* da vari gammaretrovirus murini ed aviari. In particolare, risulta decisiva in questo senso la provenienza del gene *env*, in quanto le proteine codificate da questo gene (SU e TM) sono essenziali per determinare l'infettività del virione e quindi il tropismo del vettore virale verso determinati tipi cellulari. In particolare, il virus Mo-MLV, che funge da capostipite per molti dei vettori utilizzati nella terapia genica, presenta due varianti naturali della proteina SU. La prima si lega esclusivamente al recettore murino Rec-1 (anche chiamato mCAT-1), una proteina che funge da trasportatore di membrana degli amminoacidi basici. La seconda variante interagisce con la proteina Ram-1, un trasportatore di fosfati, presente in molte specie, uomo compreso (Tabella 3.2). Ne consegue che la prima variante infetta soltanto le cellule di topo (ha, cioè, un tropismo di tipo ecotropico), mentre la seconda le cellule di qualsiasi specie (tropismo anfotropico). I virus xenotropici, infine, infettano soltanto cellule che non siano di topo (ad esempio: ratto, criceto, ecc.). Un vettore virale anfotropico, ma non uno ecotropico, può essere utilizzato per la terapia genica delle cellule umane.

Durante il processo di assemblaggio delle particelle retrovirali, il genoma virale viene incapsidato grazie all'interazione della regione  $\psi$  con la poli-proteina Gag, mentre le proteine Env (SU e TM) sono veicolate indipendentemente sulla



**Fig. 3.10.** Produzione dei vettori gammaretrovirali in una linea cellulare di *packaging*. La descrizione è riportata nel testo

membrana della cellula ospite. Ne consegue che, utilizzando il medesimo genoma, è possibile ottenere particelle virali con vari tipi di Env e quindi con diversa specificità ed efficienza di infezione. La caratteristica di una particella virale di possedere il genoma proprio di un tipo di virus ma la specificità di infezione (mediata dalla proteina Env) tipica di un altro è nota in virologia con il termine di pseudotipizzazione. La pseudotipizzazione più efficiente è conferita dalle proprietà della proteina G, presente sull'*envelope* del virus della stomatite vescicolare (VSV-G), un virus di interesse veterinario appartenente alla famiglia del virus della rabbia (Rabdovirus). L'*envelope* del VSV espone la glicoproteina G, che normalmente media l'infezione del virus legandosi ad alta efficienza ai fosfolipidi

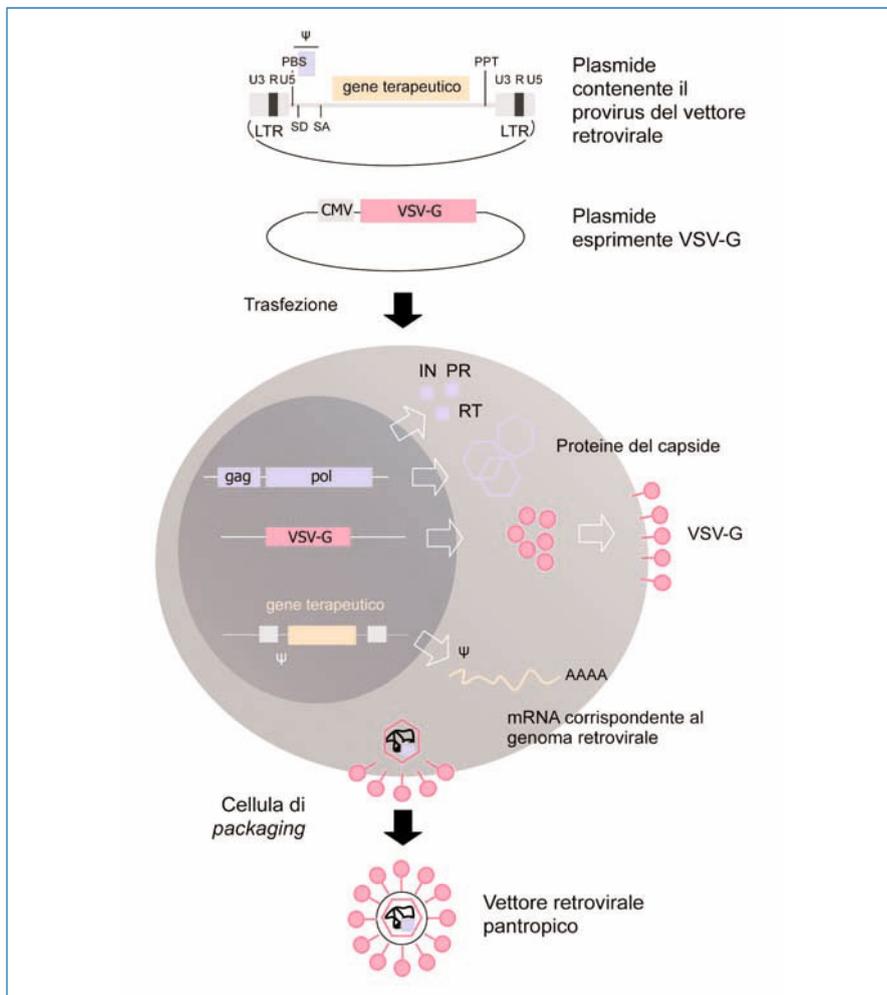
presenti virtualmente sulla membrana di tutti i tipi cellulari e innesca un meccanismo di endocitosi; una volta negli endosomi, l'abbassamento del pH proprio di questo compartimento attiva le proprietà fusogeniche di VSV-G, consentendo la fusione della membrana dell'endosoma con quella del virione, con il conseguente rilascio del contenuto del virione stesso nel citoplasma. In virtù di queste proprietà, la proteina VSV-G, una volta incorporata nell'*envelope* di un retrovirus, è quindi in grado di mediare l'ingresso del contenuto dei virioni all'interno della cellula. Pseudotipizzando i virioni retrovirali con VSV-G è quindi possibile tradurre un vasto numero di tipi cellulari con efficienze di due ordini di grandezza superiori a quelle dei vettori ecotropici o anfotropici (dell'ordine di  $\sim 1 \times 10^8$ - $1 \times 10^9$  particelle infettive/ml di sopranatante). Non è possibile esprimere stabilmente VSV-G in una linea di *packaging*, dal momento che la proteina induce la fusione delle membrane delle cellule che la esprimono e ne impedisce quindi la replicazione. I vettori retrovirali pseudotipizzati con VSV-G vengono quindi generati in linee di *packaging* che esprimono solo Gag-Pol mediante la trasfezione transeunte di due plasmidi, uno corrispondente al vettore retrovirale e l'altro esprimente VSV-G sotto il controllo di un promotore forte (di solito, quello dei geni precoci di citomegalovirus, CMV; Fig. 3.11).

### **Varianti nella costruzione dei genomi dei vettori gammaretrovirali**

Il vettore retrovirale più semplice mantiene *in cis* gli elementi genetici indispensabili per la replicazione virale (LTR, SD/SA, PBS, PPT e  $\psi$ ) e contiene il gene terapeutico clonato tra le due LTR. I siti SD ed SA possono anch'essi essere eliminati, ma spesso il loro mantenimento conferisce una maggiore stabilità all'mRNA e quindi consente livelli di espressione e replicazione più elevati.

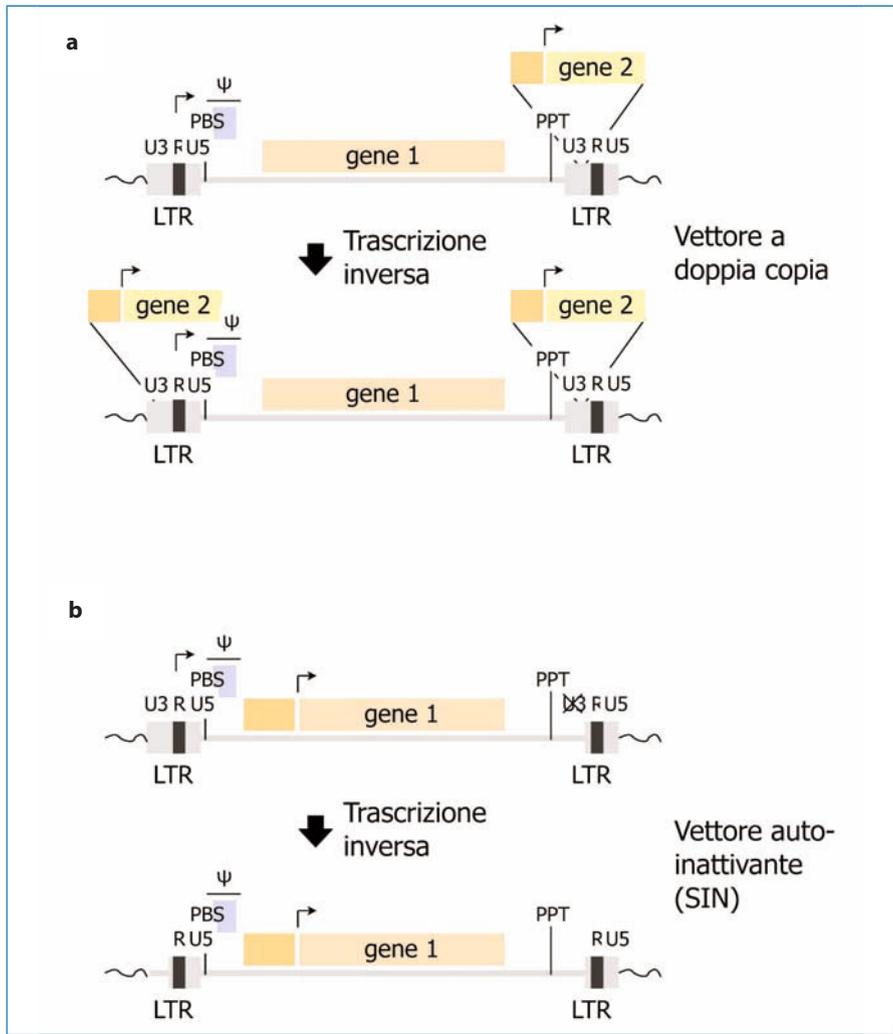
Nel corso degli ultimi anni, partendo da questa struttura semplice, sono state costruite una serie di varianti, soprattutto con lo scopo di dirigere l'espressione del gene terapeutico da parte di un promotore di scelta o di poter contenere più di un gene. Nel primo caso, tuttavia, l'introduzione di un promotore all'interno delle due LTR può interferire con la trascrizione a partire dall'LTR, trascrizione che risulta indispensabile per la produzione dell'mRNA di lunghezza genomica che viene incapsidato nel virione. Di conseguenza questo tipo di approccio funziona soltanto quando il promotore interno è scarsamente attivo nelle cellule di *packaging* (come, ad esempio, nel caso di promotori tessuto-specifici), mentre l'LTR è poco attiva nel tessuto bersaglio, in modo da non interferire con la trascrizione del gene terapeutico.

Nel caso invece si desideri esprimere due geni a partire dal promotore LTR, è possibile separarli mediante un sito interno di attacco al ribosoma (*internal ribosomal entry site*, IRES), in modo che il medesimo mRNA possa essere usato per la traduzione di due proteine diverse - gli IRES più utilizzati sono quelli che derivano dai virus della famiglia dei Picornavirus o dal virus dell'epatite C (HCV), il genoma dei quali non possiede un CAP al 5' e utilizza appunto un IRES per dirigere la traduzione delle proprie proteine.



**Fig. 3.11.** Pseudotipizzazione dei vettori retrovirali. Una linea cellulare di *packaging* che esprime soltanto Gag e Pol è trasfettata con un plasmide corrispondente al vettore retrovirale e un secondo plasmide che codifica VSV-G

Una strategia molto interessante che può essere utilizzata per l'espressione di piccoli geni terapeutici (tipicamente, ribozimi o shRNA; vedi sezione sugli Acidi nucleici terapeutici) è quella di clonare la cassetta trascrizionale che li esprime all'interno della regione U3 del LTR posizionato al 3' del vettore, senza peraltro interferire con gli elementi trascrizionali che risiedono nella stessa (Fig.3.12a). Durante il processo di trascrizione inversa nella cellula bersaglio, l'enzima RT copia questa regione U3 modificata anche a livello del neoformato LTR al 5' del provirus, duplicando quindi il gene terapeutico. All'interno di un siffatto vettore,



**Fig. 3.12.** Varianti nel disegno dello scheletro dei vettori gammaretrovirali. **a** Vettore a doppia copia, prima e dopo la trascrizione inversa; **b** vettore auto-inattivante, prima e dopo la trascrizione inversa

definito “vettore a doppia copia” può anche essere clonato un altro gene, la cui trascrizione è controllata dal LTR (ad esempio, un gene selezionabile).

Infine, un approccio di ingegneria genetica molto interessante è quello che porta alla produzione di vettori retrovirali con un LTR che si auto-inattiva (vettori *self-inactivating*, SIN). Come ricordato nel paragrafo precedente, la regione U3 dell’LTR al 5’, che controlla la trascrizione dell’intero provirus, si viene a formare durante il processo di trascrizione inversa, quando la regione U3 al 3’ del genoma

viene copiata anche a monte nel provirus. È quindi possibile costruire dei vettori virali che, nella loro forma plasmidica, contengono un LTR intatto al 5' e un LTR al 3' in cui la regione U3 è mutata o quasi interamente deleta. Nella cellula di *packaging*, questi vettori generano un trascritto che contiene la regione U3 modificata, la quale sarà duplicata anche al 5' durante il processo di trascrizione inversa nella cellula bersaglio (Fig. 3.12b). Il provirus così generato sarà incapace di dirigere la trascrizione partendo dal LTR. Se all'interno è quindi clonato il gene terapeutico sotto il controllo di un promotore specifico, sarà questo l'unico promotore attivo nelle cellule bersaglio.

### **Proprietà dei vettori gammaretrovirali**

I vettori basati sui gammaretrovirus sono stati, fino all'anno 2002, quelli di gran lunga più utilizzati nelle sperimentazioni cliniche di terapia genica. La loro popolarità era derivata dalla relativa semplicità d'uso, dall'alta efficienza con cui essi trasducono le cellule in attiva replicazione (ad esempio, le cellule in coltura *ex vivo*), dalla scarsa immunogenicità e dalla proprietà di integrare il proprio genoma (e quindi il gene terapeutico) in maniera efficiente e stabile nel genoma delle cellule infettate.

Le sperimentazioni eseguite, tuttavia, hanno portato alla luce una serie di problemi importanti, che di fatto in tempi più recenti hanno fortemente limitato l'uso di questi vettori.

1. Una prima limitazione è legata all'assoluta necessità, per i vettori gammaretrovirali, che la cellula bersaglio sia in attiva replicazione, in quanto complesso di pre-integrazione (PIC) non ha accesso al genoma della cellula ospite se non durante la mitosi, quando la membrana nucleare si dissolve. Considerando che la maggior parte delle cellule del nostro organismo, inclusi i neuroni, le cellule muscolari striate, i cardiomiociti, le cellule endoteliali e gran parte dei linfociti del sangue periferico sono cellule che si dividono raramente o non si dividono affatto, l'utilizzo di questi vettori è sostanzialmente ristretto ad applicazioni di terapia genica *ex vivo* in cellule mantenute in condizioni di attiva replicazione.
2. Una seconda essenziale limitazione dei vettori basati sui gammaretrovirus è legata al progressivo spegnimento dell'espressione del gene veicolato da parte della cellula trasdotta. Questo evento è la conseguenza della metilazione delle citosine, nel contesto del dinucleotide CpG, nella regione del promotore LTR del vettore, un evento che è associato al rimodellamento della cromatina verso uno stato compattato e non accessibile all'apparato trascrizionale. Questa risposta cellulare all'evento di trasduzione rappresenta probabilmente un meccanismo sviluppatosi evolutivamente per preservare l'integrità dell'espressione dell'informazione genetica della cellula nei confronti dell'integrazione di elementi trasponibili.
3. Un terzo grave problema che limita l'utilizzo di questi vettori è legato alla possibilità che il processo di integrazione nel genoma della cellula trasdotta, che

avviene casualmente, possa portare all'inattivazione di un gene oncosoppressore o all'attivazione di un oncogene e possa quindi causare la trasformazione in senso neoplastico della cellula. Questo evento appare in linea teorica improbabile, visto che i vettori gammaretrovirali sono incapaci di replicazione autonoma e attuano quindi un unico evento di integrazione, ma purtroppo si è drammaticamente verificato nel corso di un paio di sperimentazioni cliniche di terapia genica per l'immunodeficienza combinata grave legata al cromosoma X (SCID-X1) (vedi sezione sulle Sperimentazioni Cliniche).

Alla luce di queste considerazioni, l'utilizzo dei vettori gammaretrovirali nelle sperimentazioni cliniche di terapia genica è oggi largamente ridotto, e prevalentemente limitato alle applicazioni *ex vivo* nelle cellule staminali ematopoietiche.

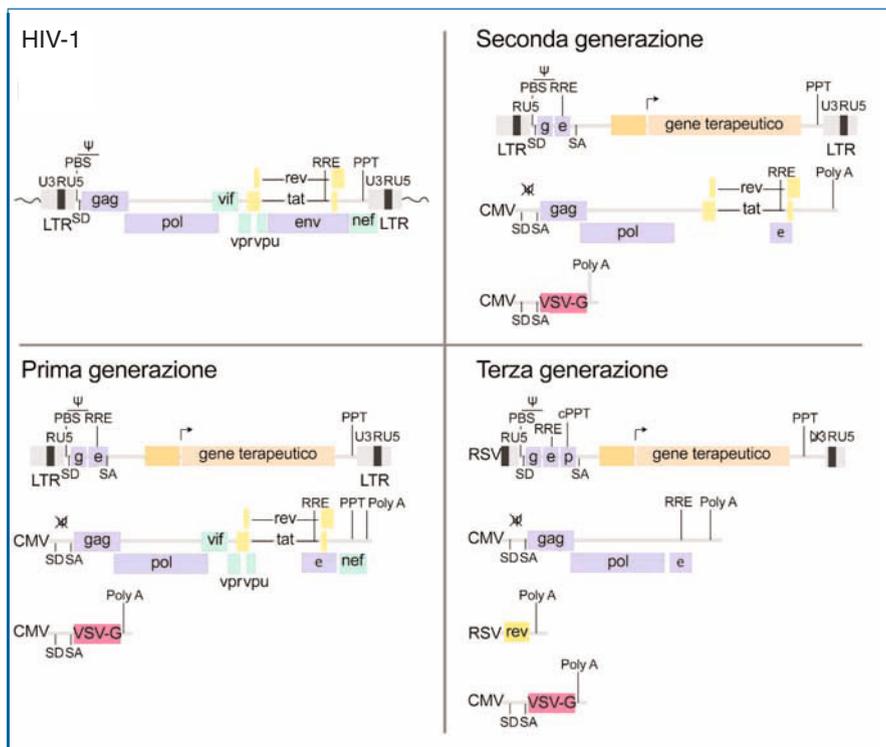
### Vettori basati sui lentivirus

Una delle peculiari caratteristiche che contraddistingue i lentivirus dai gammaretrovirus è la capacità dei primi di infettare cellule in stato non replicativo. Ad esempio, uno dei tipi cellulari più rilevanti che fungono da bersaglio per l'infezione da parte di HIV-1 è rappresentato dai macrofagi, cellule differenziate in maniera terminale e quindi fuoriuscite dal ciclo cellulare. Come ricordato nel contesto della descrizione del ciclo di replicazione dei retrovirus, questa proprietà è legata alla specifica capacità del complesso di pre-integrazione dei lentivirus, che si forma comunque nel citoplasma, di attraversare i pori nucleari ed avere quindi accesso al genoma della cellula ospite. La capacità di infettare cellule quiescenti è di grande interesse per la terapia genica, in quanto consente di ampliare in maniera significativa lo spettro dei tipi cellulari in cui è possibile ottenere il trasferimento di materiale genetico con potenzialità terapeutica; come già ricordato, la maggior parte delle cellule del nostro organismo è infatti in uno stato di quiescenza replicativa. Per questi motivi, alla fine degli anni '90 la possibilità di ottenere dei vettori retrovirali basati sui lentivirus è cominciata a risultare di grande interesse.

### Struttura e produzione dei vettori lentivirali

Il lentivirus da cui sono stati generati la maggior parte dei vettori finora disponibili è stato HIV-1, soprattutto in virtù dell'ammontare delle informazioni disponibili sulla biologia molecolare di questo virus. Negli ultimi 10 anni, sono state progressivamente sviluppate almeno 3 generazioni di vettori lentivirali, ciascuna migliore rispetto alla precedente (Fig. 3.13).

Nella prima generazione dei vettori HIV-1, le particelle virali sono generate mediante la trasfezione delle cellule con 3 plasmidi. Il primo plasmide contiene clonato, in forma provirale, il vettore lentivirale propriamente detto, in grado di veicolare il gene terapeutico. Esso comprende, in direzione 5' – 3': 1) l'LTR virale; 2) la regione leader, contenente la sequenza PBS e il segnale 5' di splicing SD;



**Fig. 3.13.** Vettori lentivirali. Rappresentazione schematica del genoma del virus HIV-1 *wild type* (in alto a sinistra) e dei plasmidi utilizzati per ottenere vettori lentivirali di prima, seconda e terza generazione. La descrizione è riportata nel testo

3) ~350 bp di *gag* nella regione corrispondente al segnale di incapsidamento  $\psi$ ; la ORF del gene è chiusa mediante l'inserimento di un codone di STOP per impedirne la traduzione; 4) ~700 bp del gene *env* contenenti la regione RRE, per consentire l'esportazione dal nucleo dell'RNA del vettore, e un segnale 3' di splicing (SA); 5) un promotore che dirige l'espressione del gene terapeutico; ciò è indispensabile in quanto il promotore naturale di HIV-1 (l'LTR) è estremamente debole in assenza della proteina virale Tat, che non è presente nei vettori per motivi di sicurezza; 6) il gene terapeutico; 7) l'LTR virale. Il secondo plasmide corrisponde al plasmide di *packaging*, anch'esso derivato dal genoma di HIV-1, che dirige l'espressione di tutte le proteine canoniche ed accessorie del virus ad eccezione di quelle codificate da *env*. Oltre ad *env*, in questo plasmide è anche mutata la sequenza  $\psi$ , per impedire l'inclusione dei trascritti da esso generati nelle particelle virali. L'espressione del plasmide è diretta dal promotore forte costitutivo dei geni immediati-precoci (IE) di citomegalovirus (CMV) e termina a livello di un sito di poliadenilazione posizionato al 3'. Il terzo plasmide codifica la proteina G di VSV.

La produzione dei vettori si ottiene in maniera transeunte mediante la trasfezione delle cellule di rene embrionale umano HEK 293 con questi tre plasmidi; virioni contenenti il gene terapeutico sono quindi prodotti nel soprannatante delle cellule, alla stregua dei vettori gammaretrovirali.

I vettori lentivirali di prima generazione, progettati in questo modo, suscitano importanti preoccupazioni relative alla loro sicurezza. Al momento della produzione, possono avvenire eventi di ricombinazione tra il plasmide di *packaging* e il plasmide recante il vettore tali da generare un lentivirus abile alla replicazione (*replication competent lentivirus*, *RCL*), la cui infettività sarebbe peraltro estesa dalla presenza della proteina VSV-G. Inoltre, se utilizzato per la terapia genica di HIV-1, un vettore di prima generazione potrebbe ricombinare con il virus *wild type* nelle cellule del paziente, con la possibilità di generare un nuovo virus potenzialmente diffusivo e patogeno. Infine, sempre nel caso dell'utilizzo di un vettore di prima generazione in un paziente infettato con HIV-1, è anche ipotizzabile che la replicazione del vettore stesso possa essere stimolata dall'infezione della cellula in cui è integrato da parte di HIV-1: in questo caso, il virus *wild type* fungerebbe da virus *helper* per la replicazione del vettore e determinerebbe la sua mobilitazione all'interno dell'organismo.

Per rispondere ad esigenze di sicurezza, si è quindi cercato di eliminare progressivamente la maggior parte delle funzioni virali non indispensabili dai sistemi di produzione dei vettori lentivirali. La seconda generazione di questi vettori contempla un sistema di produzione basato sul medesimo disegno del plasmide contenente il vettore, che viene però complementato dall'utilizzo di un plasmide di *packaging* che codifica *gag* e *pol* e in cui tutti i geni accessori di HIV-1 sono stati rimossi, ad eccezione di *tat* e *rev*. In questi modo, è minimizzata la possibilità di ricombinazione tra plasmide di *packaging* e vettore virale nelle cellule produttrici. Dal momento che il vettore comunque porta le LTR e il segnale  $\psi$  intatti, rimane tuttavia possibile da una lato la sua ricombinazione con un virus HIV-1 *wild type* e dall'altro la sua mobilitazione se utilizzato in un paziente sieropositivo, dal momento che, analogamente alla prima generazione, esso porta *in cis* tutte le sequenze indispensabili per trascrizione (LTR), incapsidamento ( $\psi$ ), trascrizione inversa (R, PBS, PPT) e integrazione (U3).

Per abolire definitivamente sia la possibilità di ricombinazione con il genoma di HIV-1 sia la mobilitazione del vettore, è stata quindi prodotta una terza generazione di vettori lentivirali, correntemente introdotta nella sperimentazione clinica, in cui la produzione dei vettori richiede la trasfezione delle cellule produttrici con 4 plasmidi. Il primo plasmide corrisponde al vettore virale, ottenuto mediante la tecnologia SIN (vedi in precedenza) per modificare le LTR. In particolare, la regione U3 del LTR al 3' viene deleta, in modo che l'LTR che si viene a formare al momento della trascrizione inversa risulti inattivo dal punto di vista trascrizionale. Nelle cellule di *packaging*, questo vettore è trascritto da un promotore eterologo attivo costitutivamente, posto a monte della regione R. Inoltre, evidenze recenti indicano che l'inclusione, all'interno del DNA provirale del vettore, di una sequenza di HIV-1 localizzata all'interno del gene *pol* aumenta in maniera significativa il titolo virale. Questa sequenza, denominata

*central polypurine tract/central termination sequence* (cPPT/CTS) funzionerebbe aumentando sia la trascrizione inversa sia il trasporto del PIC nel nucleo della cellula.

Il secondo plasmide utilizzato nel *packaging* contiene esclusivamente geni *gag* e *pol*, mentre il gene *rev* è fornito all'interno di un terzo plasmide. La presenza della proteina Rev è indispensabile nella cellula di *packaging* in quanto essa, legandosi alla sequenza RRE presente nell'RNA del plasmide di *packaging*, consente il trasporto dei messaggeri da questo prodotti nel citoplasma. Infine, il quarto plasmide utilizzato rimane quello che codifica la proteina VSV-G. Questo sistema di produzione, quindi, necessita di soltanto 3 dei 9 geni di HIV-1 ed offre pertanto un profilo di sicurezza notevolmente migliorato rispetto a quello dei vettori lentivirali di prima generazione.

Sulla base dei medesimi principi, sono stati prodotti anche vettori lentivirali di prima, seconda e terza generazione a partire dai genomi di altri lentivirus non umani (FIV, SIV, BIV, ecc.), seguendo la logica che questi potrebbero essere più accettabili per la terapia genica in quanto derivati da virus non infettivi per l'uomo.

### **Proprietà dei vettori lentivirali**

A paragone dei vettori basati sugli gammaretrovirus, il principale vantaggio che presentano i vettori lentivirali è legato alla loro proprietà di trasdurre cellule in stato non replicativo. Questo evidentemente apre la possibilità di utilizzare questi vettori direttamente *in vivo*, per la trasduzione in organi quali il sistema nervoso centrale o la retina, tessuti prevalentemente composti da cellule quiescenti. Analogamente, i vettori lentivirali possono essere utilizzati *ex vivo* sulle cellule staminali ematopoietiche senza avere la necessità di forzare la loro replicazione. Nel valutare la proprietà dei lentivirus di infettare cellule non replicanti, tuttavia, va considerato che il successo dell'infezione dipende comunque strettamente dallo stato metabolico della cellula: anche durante l'infezione naturale con HIV-1, cellule non replicanti ma metabolicamente attive quali i macrofagi sono eccellenti bersagli del virus; al contrario, i linfociti non replicanti, poco attivi dal punto di vista metabolico, lo sono in maniera molto inferiore. Questa distinzione appare particolarmente rilevante quando si consideri l'utilizzo dei vettori lentivirali per la trasduzione di cellule staminali di diversa derivazione, dal momento che queste cellule, per loro natura, sono scarsamente attive.

La problematica principale che i vettori lentivirali suscitano è relativa alla loro sicurezza e, in particolare, alla generazione di RCL, alla mobilitazione dei vettori nei pazienti infettati con HIV-1 e all'induzione di mutagenesi inserzionale.

La generazione di RCL può avvenire sia durante la produzione del vettore, mediante ricombinazione del vettore stesso con il plasmide di *packaging*, sia *in vivo*, quando è dovuta alla superinfezione delle cellule tradotte con HIV-1. In questo senso, i vettori lentivirali di terza generazione sembrano avere un profilo

di sicurezza molto migliore, grazie alla loro limitata omologia di sequenza con la sequenza di HIV-1 *wild type*.

Per quanto concerne la possibilità di mobilitazione del vettore conseguente all'infezione della cellula in cui esso è integrato da parte di HIV-1 *wild type*, questa è ben più che una possibilità teorica, dal momento che una tale evenienza è già stata osservata in pazienti infettati con HIV-1 nella prima sperimentazione clinica che ha utilizzato un vettore lentivirale (vedi sezioni sulla Terapia genica dell'infezione da HIV-1). Il vettore utilizzato, tuttavia, conteneva un LTR intatto, che è stato quindi attivato trascrizionalmente durante l'infezione da parte di HIV-1. Nella terza generazione di vettori lentivirali, al contrario, la delezione della regione U3 dell'LTR utilizzando la tecnologia SIN dovrebbe prevenire una siffatta possibilità.

Infine, rimane ancora da stabilire con precisione se anche l'utilizzo dei vettori lentivirali, analogamente a quello dei vettori gammaretrovirali, possa essere caratterizzato dall'insorgenza di eventi di mutagenesi inserzionale tali da portare all'attivazione trascrizionale inappropriata di geni cellulari. Numerosi studi compiuti negli ultimi anni hanno indicato che, effettivamente, sia i gammaretrovirus sia i lentivirus si integrano preferibilmente in corrispondenza dei geni trascrizionalmente attivi della cellula, in virtù di meccanismi non ancora compresi. La regione di integrazione corrisponde al promotore e alla regione a monte del gene nel caso dei gammaretrovirus, mentre comprende l'intero gene nel caso dei lentivirus. Dal momento che l'attivazione trascrizionale aberrante del gene nel quale il provirus è integrato dipende dall'interazione del LTR virale con il promotore del gene, è quindi probabile che i lentivirus siano meno inclini a determinare un evento di questo tipo. Inoltre, il LTR di HIV-1 è un promotore molto debole (in assenza della proteina Tat) a paragone dei LTR dei gammaretrovirus, e dovrebbe quindi essere meno efficiente nell'attivare la trascrizione del gene vicino al quale il vettore si integra. Infine, l'utilizzo della tecnologia SIN, che rimuove la regione U3 del LTR, nei vettori di terza generazione, potrebbe ridurre drasticamente la probabilità di eventi di mutagenesi inserzionale.

## Vettori basati sugli adenovirus

Il primo adenovirus fu originariamente isolato nel 1953 dal tessuto adenoideo (da cui il nome) di un bambino, prelevato durante una tonsillectomia; a tutt'oggi, sono conosciuti più di 100 diversi membri della famiglia *Adenoviridae*, in grado di infettare l'uomo e un variegato numero di specie animali, tra cui i primati non-umani, il topo, il cane, il maiale, la rana, diverse specie di uccelli, e persino alcune specie di serpenti. Gli adenovirus umani sono responsabili del 5-10% delle affezioni respiratorie acute del bambino e di un variabile numero di congiuntiviti e gastroenteriti epidemiche.

La spiccata capacità di questi virus di infettare le cellule epiteliali ha inizialmente ispirato l'idea di utilizzarli quali vettori per il trattamento delle malattie che colpiscono i polmoni e le vie aeree, prima tra tutte la fibrosi cistica. Tuttavia,

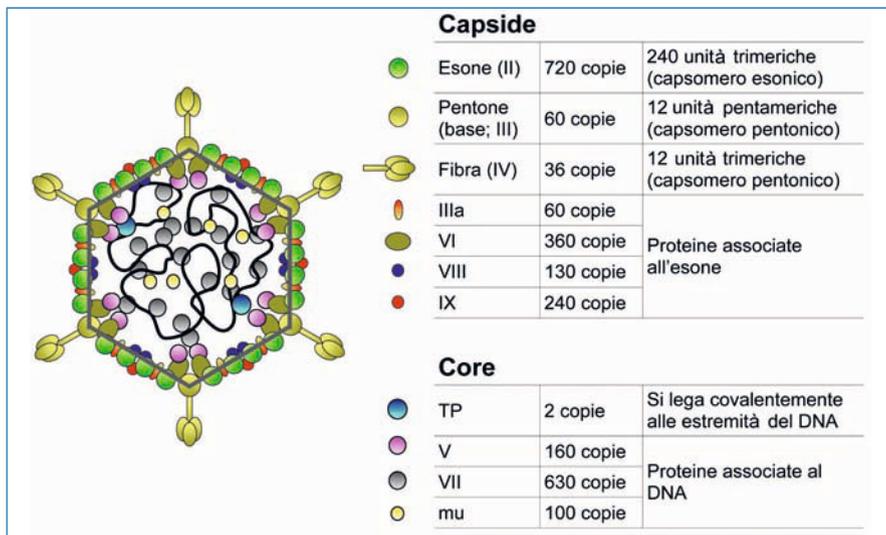
il tropismo naturale degli adenovirus per l'epitelio respiratorio e la congiuntiva è in prevalenza dettato dalle modalità con cui essi si trasmettono più che dalle proprie caratteristiche molecolari. Infatti, il recettore che media l'infezione da parte di questi virus è espresso in maniera ubiquitaria, e la maggior parte dei tipi cellulari sono in grado di sostenere la loro replicazione, indipendentemente dal fatto che la cellula sia in fase di replicazione o meno. Inoltre, una proprietà intrinseca di questi virus è la grande efficienza con cui sfruttano il macchinario cellulare per la sintesi dei propri mRNA e la traduzione delle proprie proteine: una cellula infettata con adenovirus produce alti livelli di proteine virali e quindi, nel caso dei vettori, delle proteine codificate dal gene terapeutico che essi veicolano. Tutte queste proprietà sono ovviamente molto attraenti per la terapia genica, e non sorprende quindi che, a partire dalla seconda metà degli anni '90, questi vettori siano stati oggetto di una vasta serie di ricerche e di sperimentazioni cliniche.

### **Biologia molecolare e ciclo replicativo degli adenovirus**

Sulla base della capacità di sieri umani diversi di neutralizzare l'infezione virale nelle cellule in coltura, si distinguono più di 50 sierotipi di adenovirus che infettano l'uomo. I vari sierotipi sono classificati in 6 sottogruppi (A-F) sulla base della capacità di agglutinare globuli rossi umani; il sottogruppo C comprende i sierotipi 2 e 5 (Ad2 ed Ad5), che sono quelli prevalentemente utilizzati per costruire i vettori utilizzati per la terapia genica.

#### **Struttura dei virioni**

Il virione di adenovirus consiste di un capsido a simmetria icosaedrica, con un diametro di 70-100 nm, senza pericapside, e dell'acido nucleico virale. Il capsido è composto da 20 facce costituite da triangoli equilateri identici, 12 vertici e 30 spigoli ( $T=4$ ). Le facce dell'icosaedro sono costituite da 240 proteine, definite esoni, in quanto ciascuna di esse contatta altre 6 proteine. Ciascuno dei 12 vertici è invece formato da un'altra proteina, detta pentone, in quanto ciascuna prende contatto con altre 5 proteine; ciascun pentone è costituito da una base, che forma parte della superficie del capsido, e da una fibra che si proietta all'esterno, la cui lunghezza varia nei diversi sierotipi (Fig. 3.14). Ciascun esone è formato da 3 subunità della proteina II, che quindi è la proteina più abbondante dei virioni; il trimero di proteina II è anche chiamato capsomero esonico (*hexon capsomer*). All'esone sono anche associate le proteine VI, VIII e IX. La base di ciascun pentone è formata da 5 subunità della proteina III, che si associano alla proteina IIIa, mentre la fibra è composta da 3 subunità della proteina IV; la combinazione della base del pentone e della fibra è anche chiamata capsomero pentonico (*penton capsomer*). Infine, l'interno del virione comprende quattro proteine diverse e il genoma del virus. La proteina terminale (*terminal protein*, TP) è attaccata covalentemente alle estremità del DNA virale, mentre i polipeptidi V, VII e  $\mu$  (mu) sono proteine basiche che contattano e compattano il DNA del virus.



**Fig. 3.14.** Struttura del virione di adenovirus. Il capside di adenovirus ha una caratteristica morfologia icosaedrica. È formato da tre proteine strutturali principali, l'esone (proteina II), la base del pentone (III) e la fibra (IV); cementano questa struttura le proteine minori VI, VIII, IX e IIIa. All'interno del virione, il genoma del virus è un DNA lineare a doppio filamento che porta attaccata covalentemente alle due estremità la proteina terminale TP. Il DNA virale si associa anche alle proteine VII, mu, e V; quest'ultima fornisce un legame strutturale al capside grazie alla sua interazione con la proteina VI. La tabella a destra riporta la relativa abbondanza di queste 11 proteine strutturali

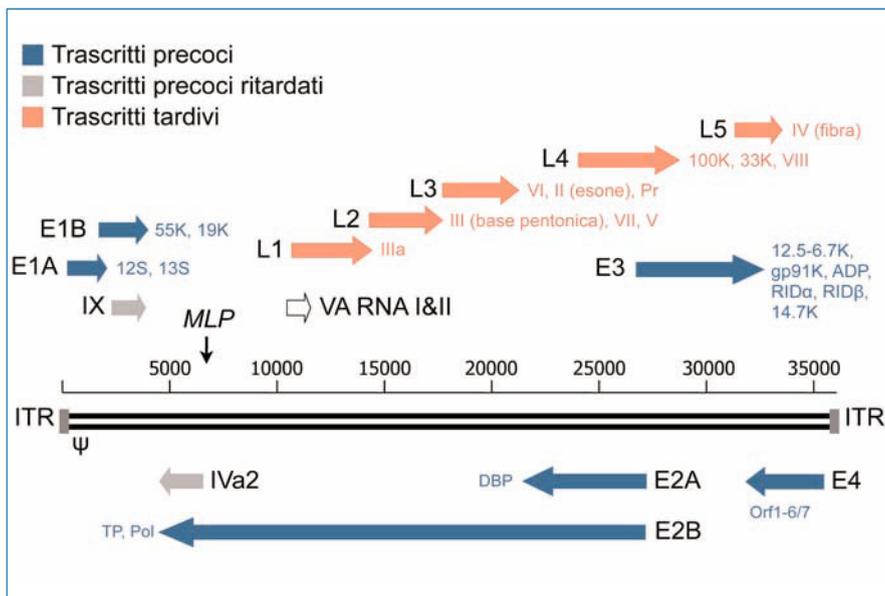
### Organizzazione del genoma

Il genoma è costituito da una molecola lineare di DNA a doppio filamento, di 36 kb nel caso di Ad2 e di Ad5, che porta alle proprie estremità due sequenze ripetute identiche, denominate *inverted terminal repeat* (ITR; 103 bp nel caso di Ad2 ed Ad5); queste regioni fungono da origini di replicazione del DNA virale.

Il genoma contiene: 1) cinque unità trascrizionali precoci, attivate immediatamente dopo l'infezione della cellula (E1A, E1B, E2 (E2A ed E2B), E3 ed E4); 2) due unità trascrizionali precoci tardive (IX e IVa2); 3) una unità trascrizionale maggiore tardiva (*major late*, ML) che è processata per generare 5 famiglie di mRNA tardivi mediante processamento post-trascrizionale (da L1 ad L5). Tutte queste unità trascrizionali sono trascritte dall'RNA polimerasi II. Il genoma virale contiene anche 1 o 2 (a seconda dei sierotipi) geni trascritti dall'RNA polimerasi III (geni VA RNA, *virus-associated*). Per convenzione, la mappa del genoma di adenovirus è presentata con il gene E1A all'estremità sinistra del genoma, e comprende quindi un'estremità "sinistra" e un'estremità "destra" (Fig. 3.15).

### Ciclo replicativo

Il ciclo replicativo degli adenovirus è convenzionalmente diviso in due fasi,



**Fig. 3.15.** Organizzazione del genoma di adenovirus. Le frecce indicano la direzione della trascrizione; sono mostrate le unità trascrizionali precoci (blu), quelle precoci ritardate (grigio) e quelle tardive (rosso). Per ogni unità trascrizionale, sono riportate le proteine che da essa derivano. La localizzazione del *major late promoter* (MLP) e del segnale di *packaging* ( $\psi$ ) è indicata. *ITR*, inverted terminal repeat

separate dal processo di replicazione del DNA virale. Gli eventi precoci (*early*) iniziano immediatamente dopo l'entrata del virus infettivo nella cellula; questi includono il legame del virus alla superficie della cellula (adsorbimento), la penetrazione del virus nella cellula, il trasporto del DNA virale nel nucleo, e l'espressione del set di geni precoci. I prodotti dei geni precoci consentono l'ulteriore espressione dei geni virali, stimolano la replicazione del DNA virale, inducono la progressione del ciclo cellulare, bloccano l'apoptosi ed antagonizzano una serie di altri eventi cellulari con potenziale funzione antivirale. La fase precoce dura circa 5-6 ore, dopo di che inizia la replicazione del genoma virale e, in maniera concomitante, la fase tardiva (*late*) di espressione, che consiste nella trascrizione dei geni tardivi e l'assemblaggio dei virioni. Il ciclo replicativo si completa in 20-24 ore nelle cellule HeLa; alla sua fine, ogni cellula ha generato circa  $1 \times 10^4$ - $1 \times 10^5$  nuove particelle virali infettive.

Il ciclo replicativo ha inizio con l'adsorbimento del virus alla membrana della cellula grazie all'interazione della porzione C-terminale della proteina della fibra, che protrude all'esterno come un pomello, con una proteina di superficie nota come CAR (*Coxsackie/Adenovirus Receptor*), che funge anche da recettore per i Cocksackievirus di tipo B, da cui il nome. In seguito a quest'interazione,

l'internalizzazione del virione nella cellula avviene con un meccanismo di endocitosi mediata da recettore all'interno di vescicole rivestite da clatrina. Più del 90% dei genomi virali internalizzati esce quindi dalle vescicole di endocitosi a livello degli endosomi precoci, grazie alla proprietà endosomolitica della proteina della base del pentone, proprietà stimolata dalla progressiva acidificazione degli endosomi. Una volta nel citoplasma, le particelle virali sono trasportate nel nucleo in maniera attiva, sfruttando l'interazione dell'esone con i microtubuli della cellula. Concomitante al processo di internalizzazione, avviene un progressivo disassemblaggio del virione, mediato dalla dissociazione e degradazione proteolitica dei suoi costituenti. Un complesso costituito dal DNA virale, associato covalentemente alla proteina TP, insieme con le proteine basiche VII, V e il peptide mu passa quindi dal citoplasma al nucleo.

Non appena il genoma di adenovirus entra nel nucleo, inizia la fase di trascrizione precoce. Questa fase ha 3 obiettivi primari, ovvero quelli di: 1) indurre la cellula ospite ad entrare nella fase S del ciclo cellulare e generare quindi un ambiente cellulare ottimale per la replicazione del virus – questa funzione è esercitata dai prodotti dei geni E1A, E1B ed E4 -; 2) proteggere la cellula infettata dai vari sistemi di difesa antivirale dell'organismo – geni E1A, E3 e VA RNA; 3) sintetizzare proteine virali indispensabili per la replicazione del DNA virale – gene E2. Tutti e tre questi obiettivi dipendono dall'attivazione trascrizionale del genoma virale mediata dal prodotto del gene E1A. In particolare, E1A interagisce da un lato con diverse proteine cellulari che controllano il ciclo cellulare, quali l'oncosoppressore pRb, stimolando l'ingresso nella fase S. D'altro canto, E1A si lega a diversi componenti del complesso basale di trascrizione, tra cui i coattivatori trascrizionali e istone-acetiltrasferasi p300/CBP e P/CAF, diversi fattori di trascrizione della cellula, e le proteine del mediatore, TBP, stimolando l'attivazione trascrizionale di una serie di geni cellulari e della maggior parte dei geni virali. La presenza delle proteine E1A nella cellula ha anche la caratteristica di attivare la proteina p53, tramite l'attivazione trascrizionale dell'oncosoppressore p19<sup>ARF</sup>, che si associa a p53 e ne modula l'attività; una delle conseguenze di questa attivazione è l'induzione di apoptosi nella cellula infettata. Tuttavia, almeno tre proteine di adenovirus svolgono attività anti-apoptotica: i due prodotti generati dal gene E1B (E1B-55K, che si lega e inattiva p53 e E1B-19K, un omologo del gene cellulare antiapoptotico Bcl-2) e la proteina E4orf6, che anch'essa si lega e inattiva p53.

L'accumulo dei prodotti dei geni E2 (DNA polimerasi, DBP e TP) segna l'inizio della fase di replicazione del genoma virale. Questa inizia dalle ITR alle due estremità del genoma e continua in entrambe le direzioni; il processo, catalizzato dalla DNA polimerasi virale, richiede il legame covalente della TP all'estremità del genoma e l'interazione di una serie di fattori cellulari (NF-I, NF-III ed altri) alle ITR. L'allungamento del DNA neosintetizzato richiede la proteina virale DBP, che si lega al DNA, e del fattore cellulare NF-II. Di regola, il genoma virale non si integra mai in quello della cellula infettata, una proprietà che è condivisa anche dai vettori adenovirali.

All'inizio della replicazione del DNA virale, incomincia anche la trascrizione dei geni tardivi di adenovirus. Questi sono organizzati in un unico lungo trascritto di circa 29.000 nt, che viene successivamente processato mediante l'utilizzo di siti di poliadenilazione e *splicing* alternativi per dare origine a una serie di mRNA. Questi possono essere raggruppati in 5 famiglie (L1-L5) sulla base dell'utilizzo di 5 diversi siti di poliadenilazione. L'espressione di tutti questi trascritti è controllata da uno specifico promotore, il *major late promoter* (MLP), attivato dal fattore di trascrizione cellulare USF/MLTF e transattivato da E1A. La traduzione degli mRNA generati da L1-L5 porta alla sintesi delle proteine strutturali del virione. L'incapsidamento del genoma virale dipende dalla presenza del segnale di incapsidamento  $\psi$ , presente a circa 260 bp dall'estremità sinistra del genoma, che consiste in una serie di sequenze ricche in AT. Il rilascio del virus è accompagnato dalla disintegrazione della membrana plasmatica e dalla lisi della cellula.

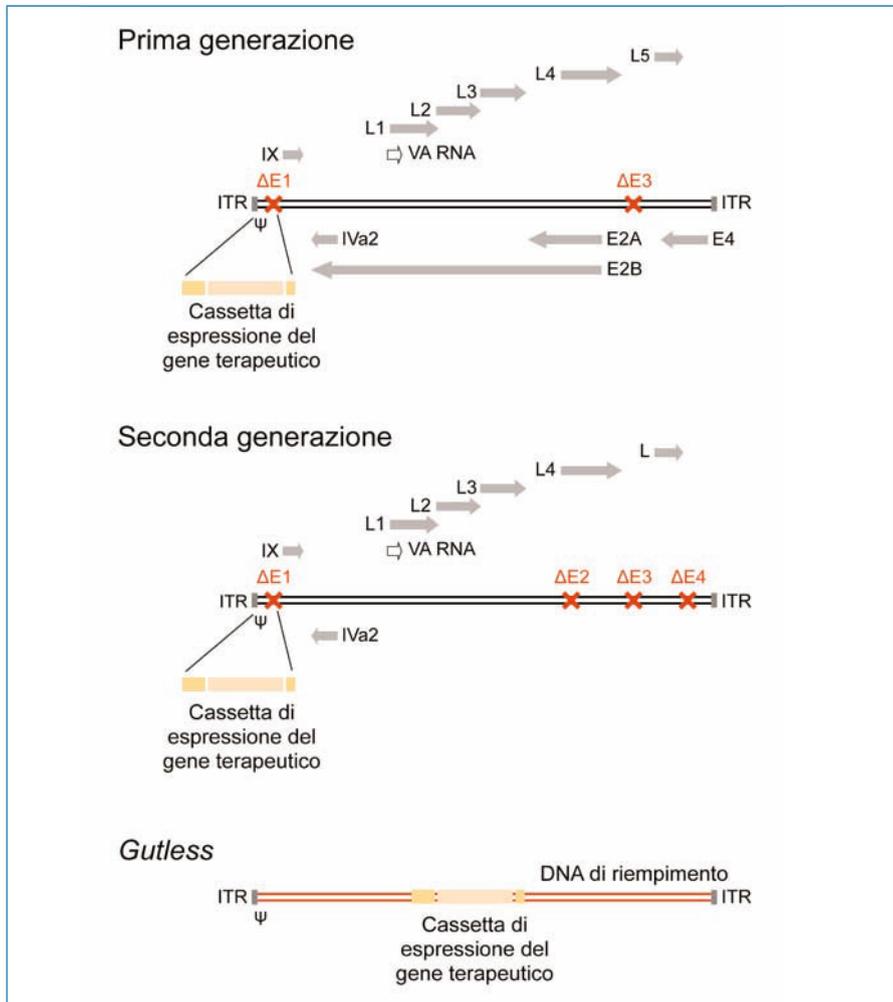
### Struttura dei vettori adenovirali

Tre diverse generazioni di vettori basati su Ad2 e Ad5 sono attualmente presi in considerazione per la terapia genica (Fig. 3.16).

La prima generazione di vettori adenovirali viene ottenuta sostituendo la regione E1, o le regioni E1 ed E3, con una cassetta di espressione contenente il gene terapeutico, un promotore e un sito di poliadenilazione. Come riportato in precedenza, la regione E1 (contenente i geni precoci E1A ed E1B) codifica le proteine indispensabili per l'espressione degli altri geni precoci e dei geni tardivi del virus. Dal momento che queste proteine sono indispensabili per la replicazione del virus, esse devono essere fornite *in trans* in linee cellulari specifiche. La regione E3 codifica proteine che sono indispensabili al virus per controbattere i meccanismi difensivi dell'ospite. Questi prodotti non sono indispensabili per la replicazione virale *in vitro*, e quindi non è necessario che vengano complementati *in trans* nelle cellule in cui vengono generati i vettori. I vettori che portano soltanto la delezione di E1 possono contenere inserti fino a 5.1 kb, quelli deleti in E1 ed E3 fino a 8.2 kb.

Nonostante i vettori deleti della regione E1 non possano replicarsi *in vivo*, l'espressione residua dei molteplici geni virali ancora contenuti in questi vettori stimola una importante risposta infiammatoria e immunitaria dell'ospite, che pone importanti problemi di sicurezza. Inoltre, la risposta immunitaria limita la durata dell'espressione del gene terapeutico in quanto le cellule trasdotte vengono eliminate dai linfociti T citotossici.

Per eliminare alcuni dei geni virali responsabili di questa stimolazione infiammatoria e immunitaria, è stata quindi ottenuta una seconda generazione di vettori adenovirali che porta aggiuntive delezioni nella regione E2 (in particolare, nei geni E2A - che codifica la proteina DBP -, E2B - proteina TP -, o DNA polimerasi), o in tutta o nella maggior parte della regione E4. Questi vettori possono contenere fino a 14 kb di materiale esogeno. Nonostante l'eliminazione di



**Fig. 3.16.** Struttura dei vettori adenovirali di prima e seconda generazione e dei vettori ad alta capacità (*high capacity*, HC) o *gutless*. Nei vettori di prima generazione, viene deletato o inattivato il gene E1, da solo o in combinazione con il gene E3. Il gene terapeutico, comprendente un promotore, il gene propriamente detto e un sito di poliadenilazione, è clonato in corrispondenza della regione E1. Nei vettori di seconda generazione, vengono introdotte mutazioni aggiuntive che inattivano i geni E2 ed E4. Infine, nei vettori *gutless*, l'intero genoma di adenovirus viene sostituito con il DNA esogeno, ad eccezione delle ITR (*inverted terminal repeat*) e del segnale di *packaging* ( $\psi$ )

queste regioni, tuttavia, i vettori di seconda generazione non risolvono del tutto il problema dell'immunogenicità, a causa della residua espressione di altri geni ancora contenuti nel genoma virale. Inoltre, l'espressione del gene terapeutico risulta inferiore in questi vettori rispetto a quelli di prima generazione.

Infine, la terza generazione di vettori adenovirali è caratterizzata dalla delezione completa del genoma di adenovirus per fare posto all'inserito di DNA esogeno, con l'eccezione delle regioni indispensabili *in cis* per la replicazione del DNA virale e l'incapsidamento del genoma nei virioni nelle cellule di *packaging*. Questi vettori vengono definiti “*gutless*” o “*gutted*” (letteralmente “eviscerati” o “senza intestino”) o “*helper-dependent*”, in quanto la loro replicazione dipende interamente dalla co-infezione delle cellule in cui avviene il *packaging* da parte di un vettore *helper* che fornisce *in trans* tutte le proteine indispensabili; vengono anche chiamati “*high capacity*” (HC), in quanto essi possono contenere fino a 37 kb di DNA esogeno, consentendo, quindi, anche il trasferimento di larghe regioni di DNA genomico o di geni multipli.

Un'ulteriore classe di virus derivati da adenovirus e utilizzati per la terapia genica dei tumori è rappresentata dai cosiddetti virus (o vettori) oncolitici, in cui è deletato soltanto il gene E1B-55K e che quindi sono capaci di replicarsi esclusivamente nelle cellule tumorali che mancano di p53. Le proprietà di questi virus mutati sono descritte nella sezione sulla Terapia genica dei tumori.

### **Produzione dei vettori adenovirali**

La produzione di vettori adenovirali è una procedura a due passaggi, che richiede prima l'ottenimento del DNA genomico virale con la sequenza desiderata e poi la sua replicazione e incapsidamento per generare particelle virali che lo contengano.

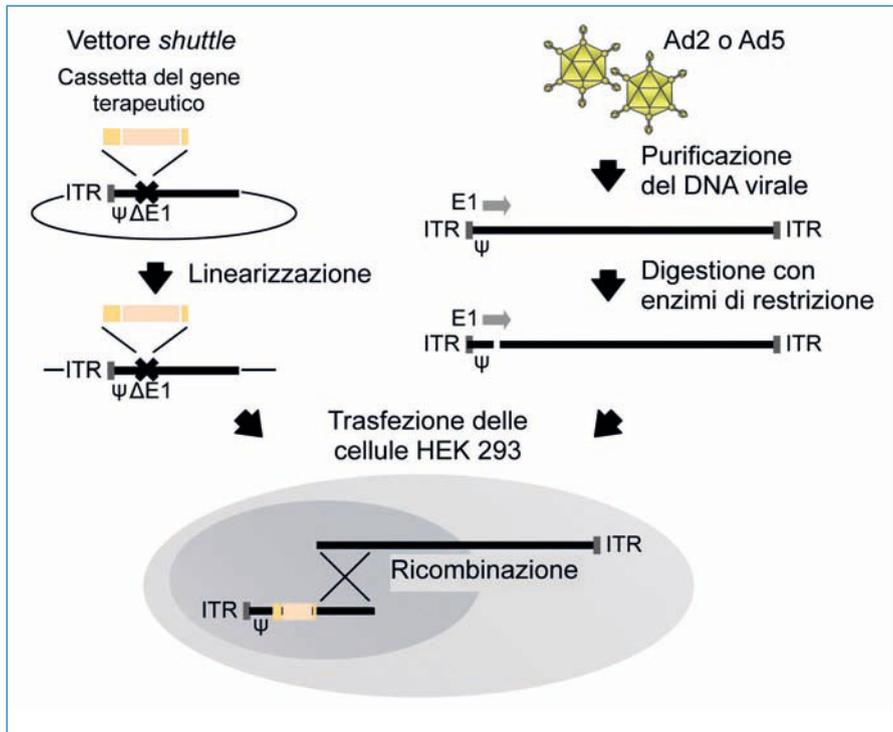
Per quanto riguarda la generazione del DNA del vettore, la relativa lunghezza del genoma di adenovirus (~38 kb) pone un ostacolo all'utilizzo delle usuali tecniche dell'ingegneria genetica, essenzialmente basate sulla creazione di molecole ricombinanti *in vitro* - grazie all'utilizzo di enzimi di restrizione ed alla ligazione di frammenti di DNA - e alla propagazione di plasmidi che le contengono nei batteri. Nel corso degli ultimi anni, quindi, è stata sviluppata una estesa serie di protocolli relativamente complessi per la produzione di vettori di prima e seconda generazione e, più recentemente, di adenovirus *gutless*.

Per quanto riguarda invece la replicazione e produzione vera e propria dei vettori, essa solitamente avviene all'interno di cellule umane che forniscono *in trans* le proteine i cui geni sono stati rimossi dal genoma del vettore (tipicamente, i geni della regione E1 (E1A ed E1B) nel caso dei vettori di prima e seconda generazione. Queste cellule sono definite cellule *helper*.

### **Produzione dei vettori di prima e seconda generazione**

La generazione di vettori adenovirali di prima o seconda generazione è sostanzialmente basata sull'ottenimento mediante eventi di ricombinazione di lunghe molecole di DNA lineare corrispondenti al genoma di adenovirus (da ITR ad ITR, incluso il segnale di incapsidamento  $\Psi$  e con una cassetta di espressione con il gene di interesse a sostituire il gene E1 e/o E3).

Il metodo classico utilizzato per generare vettori adenovirali in cui il gene di interesse è inserito nella regione E1 sfrutta gli eventi di ricombinazione che



**Fig. 3.17.** Produzione di vettori adenovirali di prima generazione mediante ricombinazione nelle cellule *helper*. Dopo trasfezione delle cellule con un vettore *shuttle* (contenente il segmento “sinistro” del genoma al cui interno è clonato il gene di interesse) e il genoma di adenovirus linearizzato, un evento di ricombinazione genera la molecola di vettore desiderata; il virus che la contiene viene successivamente propagato. *ITR*, ripetizioni terminali invertite;  $\psi$ , segnale di *packaging*. I genomi dei vettori *shuttle* e del genoma adenovirale e gli elementi genetici in esse contenuti non sono disegnati in scala

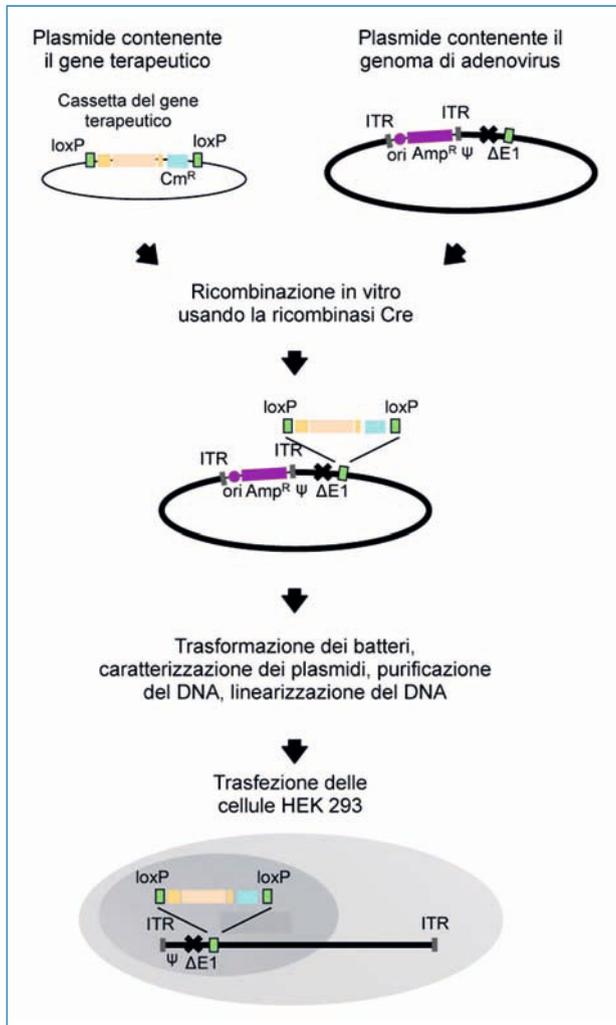
avvengono spontaneamente tra due molecole di DNA presenti all’interno della stessa cellula (Fig. 3.17). Le cellule di una linea cellulare *helper* che esprime E1 *in trans* (tipicamente, le cellule HEK 293, generate negli anni ’70 mediante trasformazione di cellule derivate dal rene embrionale umano con il DNA di Ad5) vengono trasfettate con una molecola di DNA corrispondente alla maggior parte del genoma di adenovirus a partire dall’estremità “destra” (questa molecola è generata dal genoma intero purificato del virus o da un plasmide contenente il genoma mediante digestione con un enzima di restrizione) e con un plasmide contenente la porzione “sinistra” del genoma di adenovirus, parzialmente sovrapposta a quella “destra”; in questo plasmide navetta (*shuttle*), la regione E1 è stata sostituita con la cassetta di espressione contenente il gene di interesse. Grazie alla regione di omologia, all’interno delle cellule avviene un evento di ricombinazione tra le due molecole; ancorché raro, questo evento genera un genoma virale

completo, che viene quindi incapsidato in una particella virale, che a sua volta viene rilasciata nel soprannatante delle cellule. Questo soprannatante viene utilizzato per infettare altre cellule, che vengono ricoperte da uno strato di agar, in modo che i virus prodotti non possano diffondersi nella coltura e infettino solo le cellule vicine, generando quindi delle placche di lisi. Una volta identificata una placca di lisi che produce il virus desiderato, questo viene utilizzato per l'infezione di un vasto numero di cellule *helper* e la conseguente produzione di una grande quantità di vettore.

Il metodo sopradescritto risulta lungo e laborioso (l'intera procedura solitamente richiede 2-4 settimane), in quanto la ricombinazione tra le due molecole di DNA è comunque un evento raro; inoltre, nelle cellule, oltre al virus ricombinato, si vengono a ritrovare anche virus *wild type* generati a partire da molecole di DNA originalmente non digerite dall'enzima di restrizione. La produzione del vettore, quindi, richiede molteplici passaggi successivi di infezione e analisi di numerose placche di lisi.

Per ovviare a questi problemi, negli ultimi anni sono stati sviluppati metodi migliorativi, utilizzando, come fonte di DNA virale da far ricombinare nelle cellule, dei plasmidi corrispondenti ai segmenti "destra" e "sinistra" del virus, oppure ligando i due segmenti del genoma virale *in vitro*, prima della trasfezione nelle cellule, oppure cercando di ottenere la ricombinazione nei batteri.

Alternativamente, anziché sfruttare gli eventi di ricombinazione nelle cellule *helper* o nei batteri, è possibile ottenere dei plasmidi ricombinanti corrispondenti al genoma di adenovirus e contenenti la cassetta del gene di interesse *in vitro* e successivamente amplificare questi plasmidi in *E. coli*. Il DNA plasmidico viene quindi recuperato e trasfettato nelle cellule *helper*, dove avviene la sua replicazione e incapsidamento. In particolare, l'inserimento del gene desiderato all'interno del genoma di adenovirus può essere ottenuto mediante ricombinazione sito-specifica *in vitro*. Tipicamente, viene oggi utilizzato un sistema composto da due plasmidi: 1) il primo contiene il DNA di adenovirus circolarizzato in modo da contenere, tra le due ITR, una cassetta procariotica che include un'origine di replicazione e un gene di resistenza ad un antibiotico; il DNA di adenovirus contiene il sito di *packaging* intatto e porta una delezione che inattiva la regione E1; a valle della regione E1 è posto un sito di riconoscimento per una ricombinasi di origine procariotica; 2) il secondo plasmide contiene la cassetta di espressione corrispondente al gene terapeutico e un gene di resistenza ad un antibiotico diverso da quello portato dal plasmide adenovirale; queste sequenze sono fiancheggiate da due siti di riconoscimento per la medesima ricombinasi che riconosce il bersaglio nel DNA adenovirale. I due DNA sono purificati da *E. coli*, mescolati e incubati insieme alla ricombinasi, che media quindi un evento di ricombinazione tale da inserire il segmento del DNA di interesse all'interno del genoma adenovirale. Il prodotto della reazione viene quindi utilizzato per trasformare cellule batteriche, che vengono selezionate con l'antibiotico cui il gene posizionato a fianco del gene terapeutico conferisce resistenza. Il DNA plasmidico viene quindi caratterizzato, purificato e utilizzato per trasfettare le cellule *helper*. La Figura 3.18 illustra un esempio di utilizzo di questa metodica, esempio che trae



**Fig. 3.18.** Produzione di vettori adenovirali di prima generazione mediante ricombinazione *in vitro*. La Figura illustra un esempio di generazione di un vettore adenovirale mediante ricombinazione guidata dalla ricombinasi Cre *in vitro*, seguita dall'amplificazione dei plasmidi ottenuti in *E. coli*. La proteina Cre, prodotta dal fago P1, ha come bersaglio una specifica sequenza di 34 bp, definita *loxP* (*locus of crossover* in P1). Quando due sequenze *loxP* sono presenti a distanza, Cre le riconosce e attiva un evento di ricombinazione per cui la regione di DNA tra le due sequenze viene rimossa, lasciando *in loco* una sequenza *loxP* residua. Utilizzando gli stessi siti di riconoscimento, Cre è anche in grado di mediare l'inserzione di un segmento di DNA fiancheggiato da siti *loxP* – in questo caso, il segmento derivato dal plasmide contenente il gene terapeutico – utilizzando un terzo sito *loxP* nella molecola di DNA bersaglio – in questo caso, il DNA adenovirale. *ITR*, ripetizioni terminali invertite;  $\psi$ , segnale di *packaging*; *ori*, origine di replicazione batterica; *Amp<sup>R</sup>*, gene della resistenza all'ampicillina; *Cm<sup>R</sup>*, gene della resistenza al cloramfenicolo. I genomi dei vettori *shuttle* e del genoma adenovirale e gli elementi genetici in esse contenuti non sono disegnati in scala

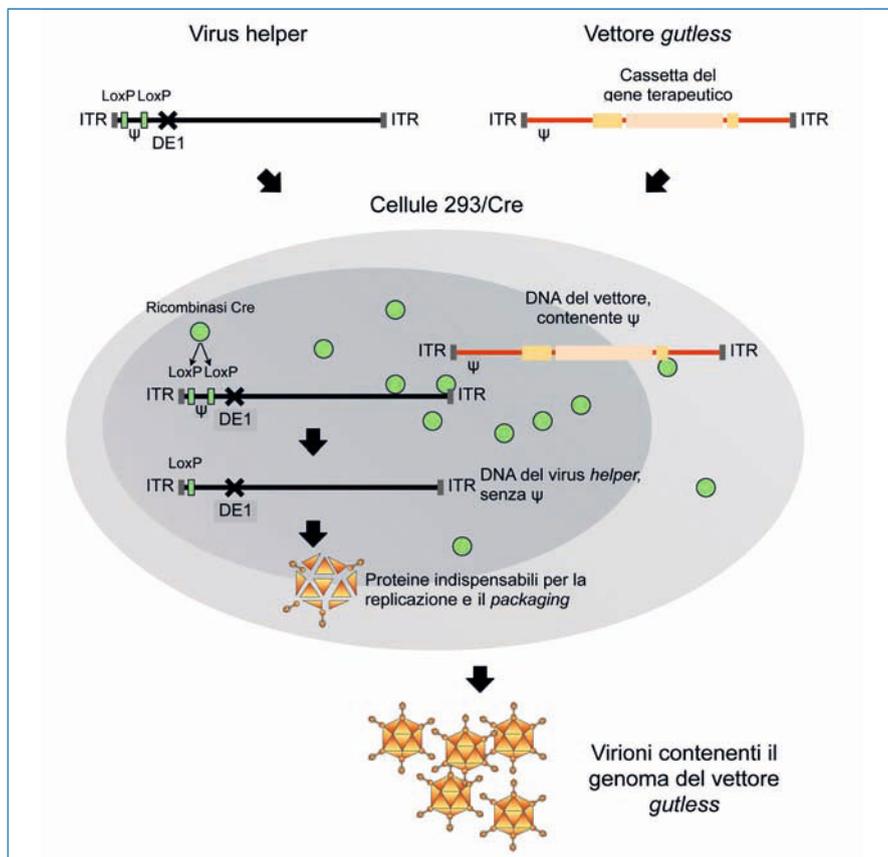
vantaggio del sistema di ricombinazione sito-specifica Cre-*loxP*. Metodiche di questo tipo sono relativamente semplici e veloci, e quindi rappresentano oggi l'approccio di prima scelta per la produzione dei vettori adenovirali, anche grazie alla disponibilità di *kit* commerciali che facilitano la procedura.

### Produzione dei vettori adenovirali *gutless*

I vettori adenovirali *gutless* mantengono soltanto le due ITR e il segnale  $\psi$ , mentre tutto il resto del genoma è sostituito dal DNA di interesse (Fig. 3.16). Dal momento che i virioni di adenovirus sono in grado di incapsidare DNA lineari che abbiano una lunghezza pari al 75-105% del genoma *wild type*, quando si vogliono utilizzare i vettori *gutless* per il trasferimento di un cDNA o comunque di una cassetta di espressione relativamente corta sussiste solitamente la necessità di completare il DNA da incapsidare con delle sequenze di riempimento (*stuffer* DNA). A questo scopo, viene utilizzato DNA di provenienza procariotica, di lievito o, meglio, sequenze di DNA derivate da larghi introni di geni umani che non contengano regioni espresse. Il DNA del vettore *gutless* così ottenuto viene clonato sotto forma di plasmide, amplificato in *E. coli*, purificato e linearizzato per liberare il frammento fiancheggiato dalle due ITR, e trasfettato in una linea cellulare *helper*.

Essendo i vettori *gutless* completamente privi di geni virali, tutte le proteine indispensabili per la replicazione del vettore devono essere fornite *in trans*. Questo viene ottenuto mediante la co-infezione delle cellule con un adenovirus in grado di replicarsi, che funge quindi da *helper*; tuttavia, mediante questa strategia, sia il genoma del vettore *gutless* sia quello del virus *helper* possono essere incapsidati, e considerevoli quantità di virus *helper* vengono quindi ad essere presenti nella preparazione finale di virus, un evento evidentemente non desiderato in vista dell'utilizzo clinico. Per evitare l'incapsidamento del genoma del virus *helper* possono essere adottate diverse strategie, tra cui la mutazione del segnale  $\psi$  del virus *helper*, l'utilizzo di virus *helper* con un genoma significativamente più lungo o più corto di quello ottimale per l'incapsidamento, o l'eliminazione del segnale  $\psi$  durante il processo di produzione virale. In particolare, la modalità finora più efficace per evitare l'incapsidamento del virus *helper* è basata su quest'ultima strategia. Cellule HEK 293 progettate in modo da esprimere la ricombinasi Cre (293Cre) vengono trasfettate con il genoma linearizzato del vettore *gutless* e infettate con un vettore adenovirale di prima generazione (deleto della regione E1) in cui il segnale  $\psi$  è fiancheggiato da due sequenze *loxP*. All'interno delle cellule, il segnale  $\psi$  viene quindi rimosso, prevenendo l'incapsidamento del genoma del virus *helper* nei virioni (Fig. 3.19). Utilizzando questo sistema, la contaminazione da parte del virus *helper* nelle preparazioni finali di vettore è dell'ordine del 0.1-10% rispetto al vettore *gutless*.

Nonostante la relativa efficienza con cui i vettori *gutless* possono essere prodotti utilizzando il metodo sopra descritto, i livelli residui di contaminazione da parte del virus *helper*, probabilmente dovuti all'incompleta efficacia della ricombinasi Cre, pongono comunque importanti problemi di sicurezza in vista della possibile applicazione clinica di questi vettori.



**Fig. 3.19.** Produzione dei vettori adenovirali *gutless*. I vettori sono prodotti nelle cellule 293/Cre trasfettate con il DNA linearizzato del vettore *gutless* e con un vettore *helper* adenovirale in cui la regione  $\psi$  è fiancheggiata da due siti *loxP*. All'interno delle cellule, la ricombinasi Cre rimuove la regione  $\psi$  dal genoma del vettore *helper*, prevenendo quindi la sua incorporazione nei virioni e consentendo l'incapsidazione selettiva del DNA del vettore *gutless*

### Purificazione e caratterizzazione dei vettori adenovirali

I virioni corrispondenti ai vettori adenovirali prodotti dalle cellule *helper* vengono purificati mediante tre centrifugazioni successive, di cui la prima è una centrifugazione convenzionale e le ultime due sono condotte in un gradiente di cloruro di cesio, in cui le particelle virali vengono separate in funzione della loro specifica densità e quindi purificate e concentrate.

Prima dell'utilizzo, le preparazioni di vettore devono essere controllate per la possibile presenza di virus in grado di replicarsi autonomamente (*replication competent adenovirus*, RCA). In particolare, le cellule HEK 293, utilizzate dalla maggior parte dei protocolli, contengono ~4.5 kb della regione del braccio "sinistro" del genoma di Ad5, comprendente la regione E1, integrata nel cromosoma 19

umano. Questa regione può quindi ricombinare con il vettore adenovirale di prima o seconda generazione, o con il virus *helper* nel caso dei vettori *gutless*, generando quindi degli RCA. Questo evento è tanto più probabile quando più larga sia la scala della preparazione del vettore; inoltre, dal momento che gli RCA si replicano in maniera più efficace del vettore, essi possono progressivamente espandersi e la contaminazione diventare progressivamente sempre più rilevante nel corso di successive produzioni. Nel caso una contaminazione da RCA sia rilevata, ad esempio mediante la PCR, il vettore originale va nuovamente isolato a partire da placche di lisi generate dalla replicazione di singoli cloni.

### **Proprietà dei vettori adenovirali**

Gli adenovirus rappresentano uno strumento molto efficace per il trasferimento genico nelle cellule di mammifero. Infatti, i vettori basati su questi virus infettano un vasto numero di cellule, siano esse in fase replicativa o quiescenti; possono essere purificati e concentrati, fino a raggiungere titoli dell'ordine di  $1 \times 10^{13}$  particelle/ml; il loro genoma non si integra nelle cellule infettate; infine, l'ultima generazione di vettori (i vettori *gutless*) può contenere frammenti di DNA esogeno grandi fino a oltre 35 kb.

Per quanto riguarda i vettori adenovirali di prima generazione, essi continuano a rappresentare uno strumento molto interessante per il trasferimento genico a scopo sperimentale. Infatti, essi possono contenere segmenti di DNA con una lunghezza compatibile con la maggior parte delle applicazioni della terapia genica (gran parte dei cDNA e cassette di espressione per corti RNA regolatori) ed è possibile ottenerne grandi quantità in maniera relativamente semplice. A livello clinico, il loro utilizzo è tuttavia limitato dalla risposta infiammatoria e immunitaria che essi suscitano, risposta che da un lato limita la durata di espressione del trasgene e dall'altro suscita importanti problemi di sicurezza. La potente induzione di una risposta infiammatoria o immunitaria fu alla base della morte, nel 1999, di un paziente di 18 anni reclutato presso l'Università della Pennsylvania a Filadelfia per il deficit ereditario dell'enzima ornitina transcarbamilasi (OTC), indispensabile per il ciclo dell'urea. Al paziente era stato iniettato nel fegato, attraverso l'arteria epatica, un vettore adenovirale di seconda generazione che veicolava il cDNA di OTC. Dopo poche ore dall'infusione di una dose relativamente alta di vettore, il paziente iniziò a manifestare gravi sintomi di tossicità sistemica, cui dopo 4 giorni seguì il decesso. La morte di questo paziente è stata successivamente attribuita ad una massiccia risposta infiammatoria dovuta all'inoculazione del vettore adenovirale, probabilmente innescata dall'attivazione di una cascata di citochine da parte del capsido virale.

Alla luce di queste problematiche, l'utilizzo clinico dei vettori adenovirali di prima e seconda generazione rimane oggi limitato alle applicazioni in cui la durata dell'espressione del trasgene non sia desiderata o richiesta e la stimolazione immunitaria sia altresì desiderabile; in pratica, questo è il caso della terapia genica dei tumori e delle vaccinazioni genetiche.

Per quanto riguarda invece i vettori *gutless*, essi non esprimono geni virali, e le cellule che li contengono non sono quindi riconosciute ed eliminate dal sistema immunitario, fatta salva la potenzialità antigenica del trasgene che veicolano. Questo risulta di particolare interesse per quelle applicazioni in cui altri vettori (in particolare, quelli AAV) non sono invece in grado di veicolare geni terapeutici particolarmente lunghi. Questo è il caso, ad esempio, della distrofia muscolare di Duchenne, una patologia causata da mutazioni del gene della distrofina (vedi sezione sulla Terapia genica delle distrofie muscolari). Il cDNA della distrofina ha una lunghezza di ~14 kb, troppo lungo, quindi, per essere veicolato nei vettori AAV ma ampiamente nei limiti di trasferimento genico da parte dei vettori adenovirali *gutless*. L'utilizzo clinico di questi vettori, tuttavia, è ancora limitato dalla quantità ancora inaccettabile di virus helper contaminante e dalla difficoltà di espandere la loro produzione su vasta scala.

### Vettori basati sul virus adeno-associato (AAV)

Prima del suo utilizzo quale vettore per la terapia genica, soltanto pochi laboratori si interessavano alla biologia del virus adeno-associato (*adeno-associated virus*, AAV). Nonostante la diffusione di questo virus in natura, infatti, esso non è mai stato associato ad alcuna patologia umana. Per questo motivo, diversi aspetti del suo ciclo vitale, inclusi molti dei determinanti molecolari che regolano il suo tropismo, sono ancora ampiamente inesplorati. Attualmente, invece, AAV rappresenta uno dei vettori potenzialmente più interessanti per il trasferimento sicuro di geni con potenziale terapeutico *in vivo*; diverse decine di sperimentazioni cliniche sono state già compiute o sono attualmente in corso.

### Biologia molecolare e ciclo replicativo di AAV

La famiglia dei Parvovirus (*Parvoviridae*, dal latino *parvus*, piccolo) comprende una estesa serie di piccoli virus a simmetria icosaedrica, sprovvisti di pericapside, contenenti un genoma a DNA a singolo filamento, che infettano numerose specie di mammiferi tra cui l'uomo. La famiglia si divide in due generi, quello degli Erythrovirus, di cui il prototipo umano è il Parvovirus B19, l'agente eziologico della quinta malattia o eritema infettivo mentre il prototipo murino è il *Minute Virus of Mice* (MVM), e quella dei Dependovirus, cui appartiene l'AAV. Mentre i membri del primo genere sono capaci di replicarsi autonomamente, la replicazione di quelli del secondo, invece, dipende strettamente dalla superinfezione della cellula con un altro virus o, più in generale, dal trattamento della cellula con una serie di agenti chimici o fisici in grado di generare uno stress genotossico o metabolico. L'AAV è stato appunto originariamente scoperto quale contaminante di colture cellulari infettate con adenovirus, da cui il nome.

I membri del genere dei Dependovirus sono molto diffusi in natura: più dell'80% degli adulti sopra i 20 anni ha di fatto una risposta anticorpale contro AAV, a testimonianza del loro precedente incontro con questo virus.

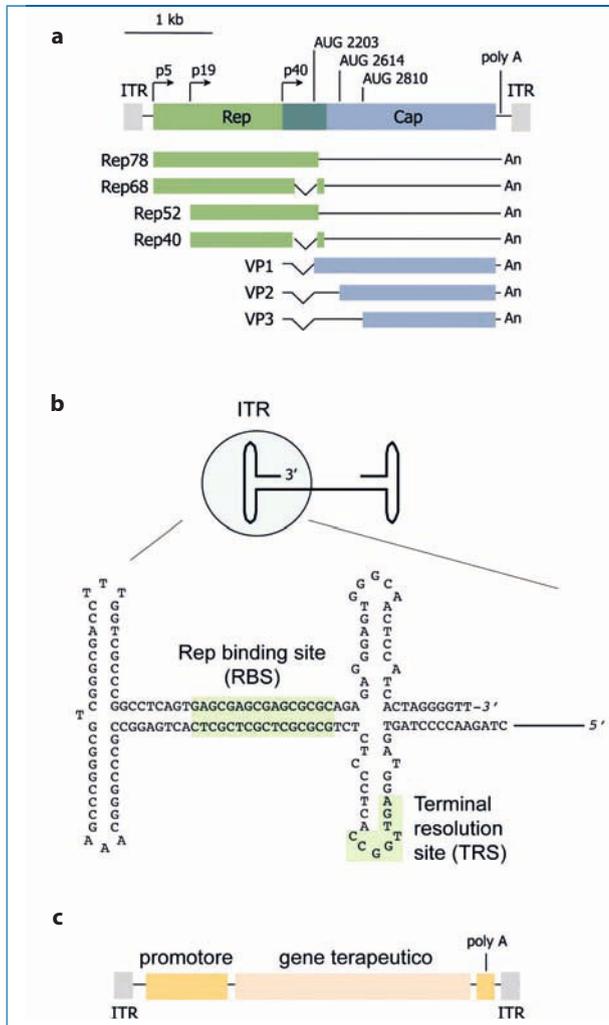
### Organizzazione del genoma

Il genoma dell'AAV, costituito da DNA a singolo filamento di circa 4.7 kb, contiene due *open reading frame* (ORF), corrispondenti ai due geni Rep e Cap, che codificano, rispettivamente, le proteine indispensabili alla replicazione del DNA e quelle del capsido del virus (Fig. 3.20a). Mediante l'utilizzo di due differenti promotori (p5 e p19) e l'inclusione alternativa di un esone, il gene *rep* codifica 4 isoforme proteiche diverse (Rep78, 68, 52 e 40). Le proteine Rep sono indispensabili per la replicazione del DNA virale, la sua integrazione nel genoma della cellula ospite e la regolazione della trascrizione dei promotori virali; sono dotate di attività endonucleasica a singolo filamento (*nickase*) ed elicastica, ovvero sono in grado di denaturare un doppio filamento di DNA. Inoltre, le proteine Rep esercitano una serie di effetti sulla cellula infettata, tra cui l'inibizione della replicazione del DNA genomico e della trascrizione di molti geni cellulari. Il gene *cap* genera invece tre polipeptidi (VP1, VP2 e VP3) mediante l'utilizzo di tre diversi siti di inizio della traduzione. Tutti i trascritti virali hanno il medesimo sito di poliadenilazione, posizionato in una regione al 5' del genoma virale. La regione codificante di AAV è fiancheggiata da due ripetizioni terminali invertite (*inverted terminal repeat*, ITR) della lunghezza di circa 145 nt, che possiedono una regione di complementarità nei primi 125 nt e formano quindi una struttura a forcina a forma di T, identica ad entrambe le estremità del genoma (Fig. 3.20b). Questa sequenza palindromica è l'unico elemento *in cis* indispensabile per tutte le maggiori funzioni dell'AAV, ovvero la replicazione del DNA virale, l'integrazione del DNA virale nel genoma della cellula ospite e l'incapsidamento del genoma virale all'interno del virione. Le prime due funzioni (replicazione e integrazione) necessitano della presenza della proteina Rep, che si lega specificamente alla sequenza dell'ITR. Le due ITR sono le uniche sequenze derivate dal genoma di AAV ad essere presenti nei vettori.

### Struttura dei virioni

I virioni dell'AAV hanno un capsido a simmetria icosaedrica (T=1) con un diametro di 18-25 nm, composto da 60 proteine. Queste comprendono 3 proteine VP1, 3 proteine VP2 e 54 proteine VP3 (rapporto: 1:1:18). Dentro il capsido trova posto una singola molecola di DNA virale a singolo filamento, che può avere polarità positiva o negativa; in una preparazione di AAV, quindi, il 50% dei virioni ha un DNA a polarità positiva, la rimanente metà il DNA complementare a polarità negativa.

Negli ultimi anni, sono stati isolati almeno 12 diversi sierotipi di AAV (AAV1-AAV12), ben caratterizzati dal punto di vista antigenico, e più di 100 altre varianti genetiche sono state ottenute mediante l'amplificazione del DNA di cellule in coltura infettate con adenovirus provenienti da tessuti umani o di primati non umani. Tutti questi virus hanno una simile struttura, dimensione e organizzazione del



**Fig. 3.20.** Organizzazione genetica di AAV. **a** Il pannello superiore mostra l'organizzazione genetica di AAV, con l'indicazione dei promotori (p5, p19, p40), i codoni AUG per la traduzione delle proteine codificate dal gene *cap*, e il sito di poliadenilazione. La parte inferiore mostra la struttura degli mRNA virali, con l'indicazione dell'organizzazione introni-esoni e delle proteine codificate. *ITR*, inverted terminal repeat; *An*, coda di poly-A. **b** Ingrandimento della regione ITR, con l'indicazione del sito di legame a Rep (RBS) e la *terminal resolution site* (TRS). **c** Rappresentazione schematica della struttura di un vettore AAV

genoma e differiscono in maniera significativa soltanto per la composizione amminoacidica delle proteine del capsido. L'omologia di sequenza tra queste proteine va dal 55 al 99%, e determina in maniera sostanziale l'identità dei recettori cellulari utilizzati per l'ingresso della cellula. In termini generali, tutti gli AAV utilizzano recettori ubiquitari e abbondanti in diversi tipi cellulari (Tabella 3.3). Il sierotipo più caratterizzato, e quello su cui si basano la maggior parte dei vettori attualmente utilizzati per la sperimentazione clinica, è l'AAV2, che si lega ai proteoglicani contenenti eparan-solfati (*heparan sulphate proteoglycans*, HSPG) della superficie cellulare; fungono da co-recettori (non peraltro sempre indispensabili) le integrine  $\alpha v\beta 5$  e i recettori per il fattore di crescita dei fibroblasti o degli epatociti (FGFR-1 e HGFR-1). Analogamente all'AAV2, anche

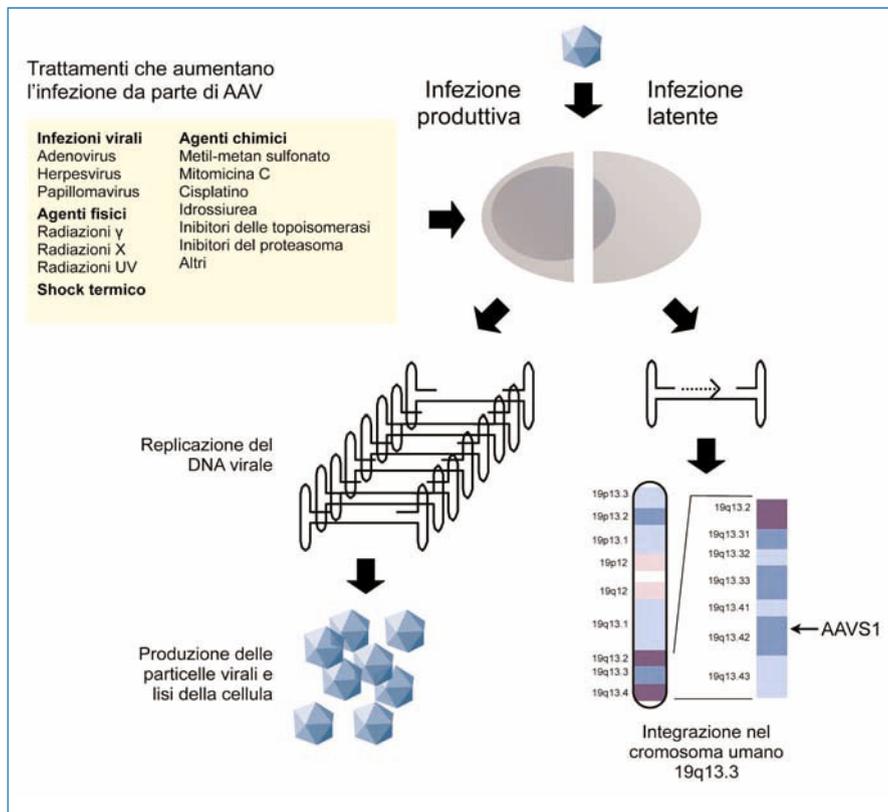
**Tabella 3.3.** Recettori di alcuni Parvovirus

Parvovirus	Recettore
AAV1	Acido sialico (legami $\alpha 2$ -3-N e $\alpha 2$ -6-N)
AAV2	Proteoglicani contenenti eparan-solfati (HSPG) Corecettori: integrina $\alpha v\beta 5$ , FGFR1, HGF-R
AAV3	Proteoglicani contenenti eparan-solfati (HSPG)
AAV4	Acido sialico (legami $\alpha 2$ -3-O)
AAV5	Acido sialico (legami $\alpha 2$ -3-O e $\alpha 2$ -3-N) Recettore del PDGF (PDGFR)
AAV6	Acido sialico (legami $\alpha 2$ -3-N e $\alpha 2$ -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

l'AAV3 si lega agli HSPG. Al contrario, AAV1, AAV4, AAV5 e AAV6 interagiscono con residui di acido sialico (acido N-acetil neuramminico), variamente legati all'estremità dei glicani della superficie della cellula. AAV8 interagisce con una proteina specifica, LamR, che nella cellula esercita funzioni multiple tra cui quella di recettore per la laminina extracellulare.

### Ciclo replicativo

Dopo il legame con i recettori di superficie, l'AAV è internalizzato nella cellula tramite un processo di endocitosi mediata da recettore e si viene quindi a trovare all'interno delle vescicole endosomali. Nonostante il virus sia in grado di penetrare in svariati tipi cellulari, grazie alla proprietà del suo capsido di interagire con recettori ubiquitari, l'esito dell'infezione dipende strettamente dalle condizioni fisiologiche della cellula che infetta (Fig. 3.21). Se questa è sottoposta ad uno stress genotossico (ottenuto, ad esempio, trattando le cellule con radiazioni X, radiazioni  $\gamma$  o agenti chimici in grado di danneggiare il DNA) oppure è infettata con un altro virus (tipicamente, con adenovirus), il DNA virale, una volta



**Fig. 3.21.** Ciclo replicativo di AAV. Rappresentazione schematica del ciclo replicativo di AAV, in condizioni permissive (*a sinistra*) e non permissive (*a destra*). Nel secondo caso, il DNA virale si integra in maniera sito-specifica nella regione AAVS1 del cromosoma 19q13.3-qter. Ulteriori dettagli sono riportati nel testo

uscito dagli endosomi e trasportato nel nucleo, viene replicato rapidamente dalle proteine cellulari con l'ausilio essenziale della proteina Rep. In poche ore, ogni cellula produce  $5 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  particelle virali, che portano alla lisi della cellula e al rilascio del virus nell'ambiente esterno.

In situazioni normali, tuttavia, la maggior parte delle cellule non è permissiva alla replicazione virale. Un'efficiente replicazione, infatti, richiede che i virioni escano dagli endosomi, vengano trasportati nel nucleo, ne venga rimosso il capsido e, soprattutto, che il genoma a singolo filamento sia inizialmente convertito a doppio filamento di DNA. Un impedimento in uno qualsiasi di questi passaggi di fatto blocca l'instaurarsi di un'infezione produttiva.

In condizioni non permissive, tuttavia, in una frazione delle cellule infettate, il genoma di AAV va comunque a integrarsi in maniera sito-specifica in una determinata regione del cromosoma umano 19q13.3-qter, chiamata AAVS1 e

posta immediatamente a monte del gene che codifica la proteina MBS85 (*myosin binding subunit 85*). La capacità di integrarsi in questa regione è strettamente dipendente dalla presenza della proteina Rep, che riconosce una breve regione di omologia all'interno di AAVS1 e media, quindi, con l'ausilio di una serie di proteine cellulari non ancora completamente identificate, un processo di ricombinazione semi-omologa (Fig. 3.21). Questo evento rappresenta l'unico esempio di integrazione sito-specifica che si conosca finora nelle cellule di mammifero.

Non è ancora noto quali siano i determinanti che, a livello molecolare, determinano la permissività delle cellule all'infezione da AAV nè quale sia l'esatto meccanismo con cui l'induzione di un danno al DNA o la presenza di un'altra infezione virale consentano la replicazione del virus. Evidenze sperimentali recenti indicano che il macchinario cellulare che normalmente riconosce il danno al DNA, e in particolare le proteine del complesso MRN (Mre11, Rad50 e Nbs1), si lega al genoma a singolo filamento di AAV come se fosse una struttura di DNA danneggiato e ne blocca la conversione da singolo a doppio filamento. In presenza di un danno genotossico, le proteine del complesso MRN vanno a riconoscere le regioni del DNA cellulare danneggiato, e lasciano quindi libero il DNA di AAV, consentendo la sua replicazione. Nel caso della coinfezione con adenovirus, l'effetto *helper* sulla replicazione di AAV è mediato da alcuni geni virali, ovvero quelli codificati dalle regioni precoci E1A/E1B, E2A, E4 (in particolare, E4orf6) e quello che codifica l'RNA VA-I. Le proteine E1B-55K ed E4orf6 di adenovirus sono appunto in grado di indurre la degradazione del complesso cellulare MRN.

### Struttura e produzione dei vettori AAV

Il genoma dell'AAV può essere convertito in una forma a doppio filamento e clonato all'interno di un plasmide; se la sequenza delle ITR rimane intatta, le proteine Rep sono in grado di determinare l'escissione del genoma dal plasmide e iniziare la replicazione del DNA virale. Questo processo richiede esclusivamente le ITR *in cis* e la proteina Rep *in trans*. Se la cellula esprime anche le proteine codificate dal gene *cap*, il DNA a singolo filamento che si forma viene incapsidato a formare virioni infettivi grazie all'interazione delle ITR con le proteine VP1-3.

I vettori AAV vengono usualmente generati a partire dal genoma del sierotipo 2 (AAV2), clonato sotto forma di plasmide, rimuovendo tutte le sequenze virali ad eccezione delle due ITR (~145 bp ciascuna). Tra le due ITR viene clonata una cassetta di espressione costituita da un promotore, dal gene terapeutico e da un segnale di poliadenilazione (Fig. 3.20c). Per dirigere l'espressione del gene terapeutico può essere utilizzata un'estesa serie di promotori di origine cellulare o virale, costitutivi, inducibili o tessuto-specifici. La cassetta trascrizionale clonata tra le due ITR può occupare fino a circa 4-4.5 kb.

L'espressione delle proteine Rep ha un effetto tossico, in quanto esse interferiscono con diversi processi essenziali per la vitalità della cellula, quali la replicazione

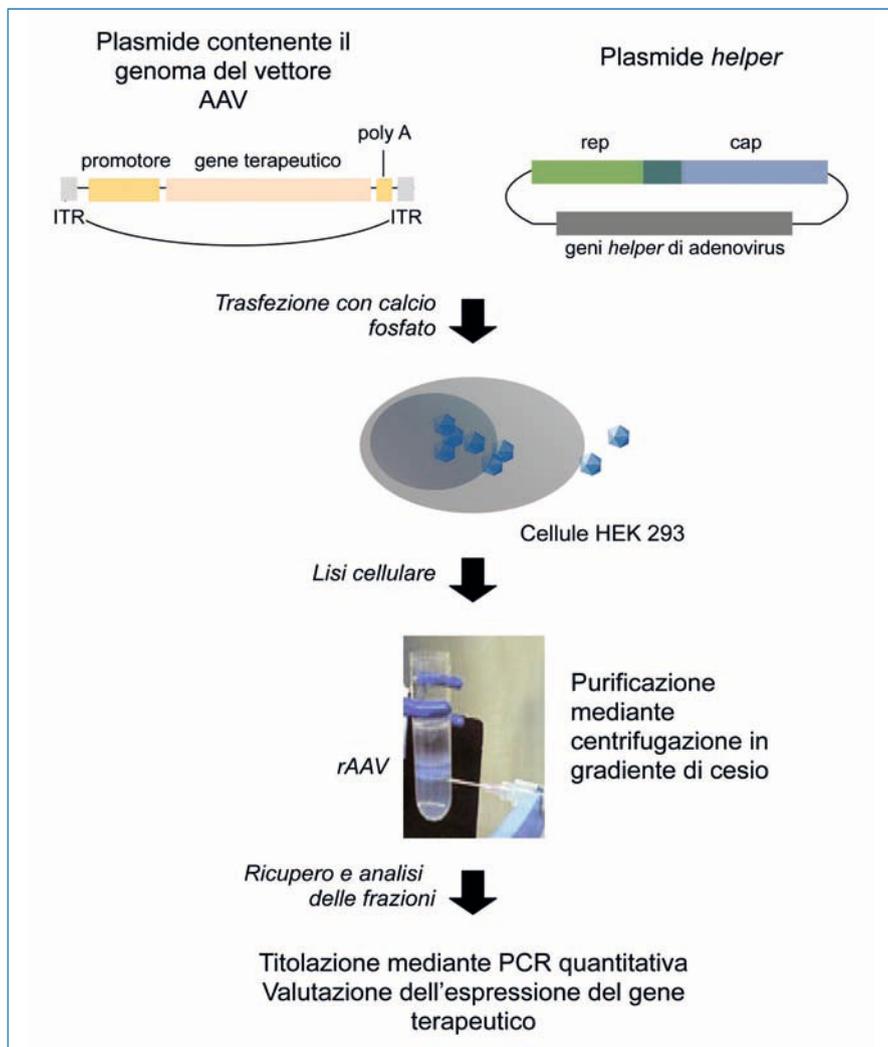
del DNA genomico e la trascrizione dei geni cellulari. Per questo motivo, non è possibile ottenere delle linee cellulari di *packaging* in grado di esprimere costitutivamente il gene *rep*. Quindi, i vettori AAV vengono prodotti mediante trasfezione transeunte delle cellule HEK 293 con un plasmide contenente il vettore AAV, come sopra descritto, e un plasmide contenente i geni *rep* e *cap* dell'AAV ma sprovvisto delle ITR. Per stimolare la permissività delle cellule alla replicazione di AAV, queste devono quindi essere infettate con adenovirus, o, in maniera più conveniente, trasfettate con un terzo plasmide che porta i geni *helper* di adenovirus E2A, E4 e VA-I RNA; i geni E1A ed E1B sono direttamente espressi dalle cellule HEK 293. Molti laboratori interessati alla produzione di AAV utilizzano oggi un unico plasmide *helper*, che contiene sia i geni *rep* e *cap* di AAV2 sia i geni di adenovirus; in questo caso, la produzione del vettore contempla la trasfezione delle cellule con due soli plasmidi, quello *helper* e quello corrispondente al vettore AAV (Fig. 3.22).

Dopo 48 ore dalla trasfezione, le cellule iniziano a mostrare un chiaro effetto citopatico, dovuto alla replicazione del virus, e, sia nel soprannatante della coltura sia nel lisato cellulare, si accumula una grande quantità di virioni. A differenza dei vettori retrovirali, i virioni di AAV sono molto resistenti alle manipolazioni e agli agenti chimici e fisici e possono essere efficacemente purificati mediante centrifugazione su gradiente di cloruro di cesio o iodixanolo, o tramite cromatografia. Le preparazioni virali così ottenute hanno un grado di purezza tale da poter essere inoculate negli animali da esperimento o nell'uomo. I titoli che si ottengono possono arrivare a  $1 \times 10^{14}$  particelle virali per ml; la concentrazione di questi vettori è quindi di 5 ordini di grandezza superiore a quella dei vettori retrovirali pseudotipizzati con VSV-G e di 2-3 ordini di grandezza superiore a quella dei vettori basati su adenovirus.

Il sistema di produzione classico di AAV prevede l'utilizzo delle ITR di AAV2 congiuntamente ai geni *rep* e *cap* sempre di AAV2. Tuttavia, le proteine capsidiche corrispondenti a qualsiasi sierotipo di AAV sono in grado di riconoscere le ITR di AAV2 e di mediare l'incorporazione del genoma del vettore all'interno dei virioni. È possibile quindi cambiare il sierotipo del vettore semplicemente utilizzando, al momento della sua produzione, un gene *cap* corrispondente al sierotipo desiderato. Vengono oggi correntemente utilizzati vettori AAV portanti il capsido dei sierotipi 1-9, con diverse proprietà di tropismo d'organo (vedi in seguito).

### **Proprietà dei vettori AAV**

Quando iniettati *in vivo*, i vettori AAV risultano estremamente efficienti su particolari tipi di cellule, tutte caratterizzate dal fatto di essere differenziate in maniera terminale e di essere fuoriuscite permanentemente dal ciclo cellulare (cellule post-mitotiche). Questo è il caso dei cardiomiociti, delle fibre muscolari striate, dei neuroni, di diversi tipi cellulari della retina - tra cui le cellule ganglionari, i fotorecettori e le cellule dell'epitelio pigmentato -, e, in maniera minore, degli epatociti. In queste cellule, il genoma dell'AAV viene efficientemente



**Fig. 3.22.** Produzione dei vettori AAV. Per produrre i vettori AAV, due plasmidi vengono trasfettati in maniera transiente nelle cellule HEK 293. Il primo plasmide corrisponde al vettore AAV stesso, in cui la cassetta del gene terapeutico è fiancheggiata dagli *inverted terminal repeat* (ITR), il secondo codifica le proteine Rep e Cap e per le proteine di adenovirus che forniscono *in trans* le funzioni *helper*. Venti-quattro ore dopo la trasfezione, le cellule vengono lisate ed i vettori sono purificati mediante centrifugazione su gradiente di cloruro di cesio

trasportato nel nucleo e convertito in DNA a doppio filamento. Diverse copie del DNA del vettore quindi moltiplicano e rimangono in forma episomale, non integrata, nel nucleo delle cellule trasdotte.

A dimostrazione dell'importanza, nel determinare l'efficienza dei vettori AAV, del passaggio di conversione da singolo a doppio filamento di DNA del genoma virale, i vettori che portano la cassetta del gene terapeutico clonata sotto forma di due copie complementari, posizionate in tandem l'una di seguito all'altra, sono in grado di generare spontaneamente un DNA a doppio filamento, complementandosi internamente, e risultano significativamente più efficaci dei vettori tradizionali. Tali vettori, denominati AAV con auto-complementarietà (*self-complementary* AAV, scAAV) hanno tuttavia capacità di clonazione dimezzata in termini di lunghezza (max. ~2.5 kb).

Risulta importante osservare che l'integrazione del genoma del virus AAV *wild type* in una specifica localizzazione del genoma della cellula ospite (regione AAVS1) è strettamente dipendente dall'azione delle proteine Rep. Dal momento che il gene che codifica queste proteine non è presente nei vettori, la loro integrazione nel genoma della cellula ospite non avviene o, nel caso in cui in minima parte avvenga, essa è del tutto casuale in termini di specificità di sequenza. Nonostante la mancata integrazione dei vettori, le cellule che mostrano un'elevata permissività naturale all'infezione da AAV sono tutte cellule post-mitotiche, che non si dividono e persistono per molti mesi o anni, in alcuni casi quali il cuore, il cervello, la retina, per tutta la vita. Inoltre, nella loro forma episomale, il DNA dei vettori AAV non va incontro a problemi di silenziamento dell'espressione genica, come avviene nel caso dei vettori gammaretrovirali. L'espressione del gene terapeutico, quindi, viene mantenuta per periodi di tempo molto prolungati che, almeno nei roditori, corrispondono a tutta la vita dell'animale.

I diversi sierotipi di AAV mostrano un profilo di efficienza diverso nei vari tessuti, e, da un lato, aumentano l'efficienza con cui determinati tipi cellulari naturalmente permissivi vengono trasdotti mentre dall'altro ampliano il numero di organi in cui AAV può essere utilizzato (Tabella 3.4). Ad esempio, il muscolo è trasdotto in maniera particolarmente efficiente da AAV1, AAV6 (che differisce di soli 6 amminoacidi da AAV1) e AAV7; il polmone da AAV5; nella retina, i fotorecettori sono un eccellente bersaglio per AAV5 mentre l'epitelio pigmentato lo è per AAV5 e AAV4; infine, AAV8 trasduce in maniera efficiente il pancreas endocrino ed esocrino, e il fegato. Tra gli isolati più recenti, i sierotipi 8 e 9 mostrano la capacità di passare attraverso gli endoteli dei vasi sanguigni e, quando somministrati per via endovenosa o intra-peritoneale nell'animale da esperimento, sono in grado di trasdurre efficientemente il cuore e i muscoli scheletrici.

Le caratteristiche biologiche dei vettori AAV (mancata stimolazione infiammatoria e immunitaria dell'ospite, persistenza dell'espressione del trasgene, possibilità di essere prodotti ad alto titolo) e il loro peculiare tropismo per le cellule post-mitotiche hanno incoraggiato, negli ultimi 5 anni, l'allestimento di diverse decine di sperimentazioni cliniche, di cui particolare rilevanza sembrano avere quelle a livello del cervello (morbo di Parkinson e morbo di Alzheimer), della retina (amaurosi congenita) e del cuore (scompenso cardiaco).

**Tabella 3.4.** Tropismo d'organo dei sierotipi di AAV

Organo	Sierotipo (in ordine di efficienza)	
Fegato	AAV8, AAV9	
Muscolo scheletrico	AAV1, AAV7, AAV6, AAV8, AAV9, AAV2, AAV3	
Sistema nervoso centrale	AAV5, AAV1, AAV4, AAV2	
Occhio	Epitelio pigmentato Fotorecettori	AAV5, AAV4, AAV1, AAV6 AAV5
Polmone	AAV5, AAV9	
Cuore	AAV9, AAV8	
Pancreas	AAV8	
Rene	AAV2	

### Vettori basati sul virus dell'herpes simplex (HSV)

Diversi aspetti della biologia del virus dell'herpes simplex di tipo 1 (HSV-1) suggeriscono il potenziale valore di questo virus quale vettore per la terapia genica. Tra questi vanno ricordati: 1) l'ampio spettro d'ospite, dal momento che molti recettori che il virus utilizza per il suo ingresso nella cellula (quali gli HSPG e la nectina 1, sono espressi diffusamente sulla superficie di numerose cellule; 2) l'alta infettività; 3) la capacità di infettare efficientemente le cellule che non si replicano; 4) il fatto che almeno metà dei più degli 80 geni noti di HSV-1 non sono indispensabili per la replicazione del virus nelle cellule in coltura e possono essere quindi rimossi per fare spazio al trasgene e alle sue sequenze regolatorie; 5) la possibilità di produrre vettori ad alto titolo senza problemi di contaminazione con virus *wild type*; infine, 6) la proprietà del virus di stabilire infezioni latenti che durano per lunghissimo tempo nei neuroni, proprietà che può essere sfruttata per esprimere geni terapeutici selettivamente in queste cellule. D'altro canto, la relativa complessità del genoma virale e l'ancora inadeguata comprensione delle proprietà molecolari di diverse delle proteine da esso codificate ne limitano ancora un utilizzo esteso.

### Biologia molecolare e ciclo replicativo degli herpesvirus

La famiglia degli *Herpesviridae* comprende una vasta serie di virus, molto diffusi nella maggior parte delle specie animali, che comprende più di 130 virus diversi,

di cui almeno 9 infettano l'uomo: il virus dell'herpes simplex di tipo 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2), il citomegalovirus (CMV), il virus della varicella-zoster (VZV), il virus di Epstein-Barr (EBV) ed gli herpesvirus umani di tipo 6A, 6B, 7 e 8 (HHV-6A, HHV-6B, HHV-7 ed HHV-8).

Tutti i membri della famiglia condividono almeno tre caratteristiche biologiche che li caratterizzano: 1) la proprietà di codificare una vasta serie di enzimi coinvolti nel metabolismo degli acidi nucleici, tra cui la timidino-chinasi (TK), che viene utilizzata in alcune applicazioni di terapia genica dei tumori in qualità di gene suicida; vedi Sperimentazioni cliniche di terapia genica; 2) la localizzazione nucleare del sito di replicazione virale e di assemblaggio del capsido; 3) la capacità di instaurare due tipi di infezione, una produttiva che porta alla produzione di nuove particelle virali e alla lisi della cellula infetta, e una latente, in cui il genoma virale è mantenuto sotto forma di molecola di DNA a doppio filamento circolare chiusa e solo una piccola frazione dei geni virali viene espressa.

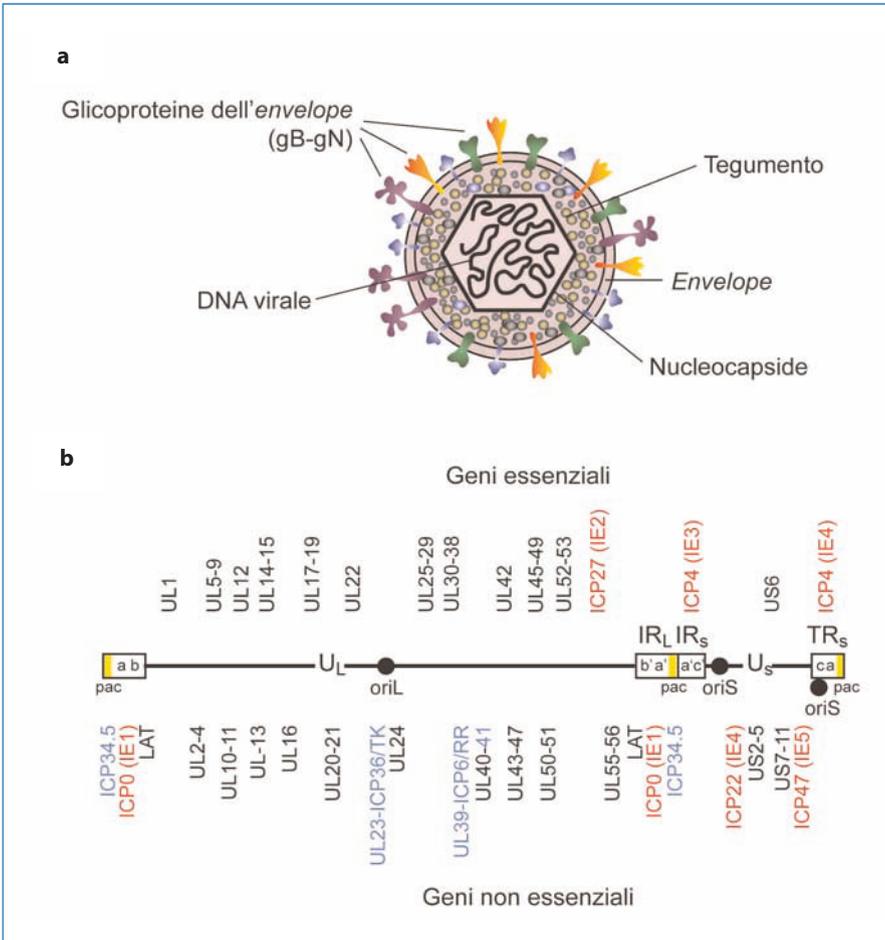
I membri della famiglia degli hepervirus sono stati inizialmente classificati in tre sotto-famiglie: gli alfaherpesvirus - caratterizzati da spettro d'ospite ampio, ciclo replicativo rapido e capacità di stabilire infezioni latenti prevalentemente nei gangli sensoriali -, cui appartengono, tra gli herpesvirus umani, HSV-1, HSV-2 e VSV; i betaherpesvirus - che mostrano uno spettro d'ospite più ristretto, hanno un ciclo replicativo più lungo e sono capaci di stabilire infezioni latenti nelle ghiandole secretorie, le cellule del sistema linforeticolare e il rene -, cui appartengono CMV, HHV-6 ed HHV-7, e i gammaherpesvirus - che mostrano prevalentemente un tropismo specifico per le cellule linfoidi -, cui appartengono EBV ed HHV-8.

### **Organizzazione del genoma**

Gli herpesvirus hanno un genoma composto da DNA a doppio filamento lineare di grandi dimensioni (120-250 kb). In particolare, il genoma di HSV-1 ha 152 kb e codifica almeno 84 geni, classificati, a seconda del momento in cui sono espressi nel ciclo replicativo del virus, in geni immediati precoci (*immediate early*, IE), precoci (*early*, E) o tardivi (*late*, L). I geni IE codificano proteine regolatorie, quelli E i fattori necessari per la replicazione virale, mentre i prodotti dei geni L sono soprattutto proteine strutturali dei virioni.

### **Struttura dei virioni**

Tutti i membri della famiglia degli herpesvirus sono caratterizzati da una comune struttura del virione, costituita da un nucleo centrale (*core*) che contiene il DNA genomico, un capsido icosaedrico composto da 162 capsomeri, una struttura dall'apparenza amorfa che circonda il capsido, denominata tegumento, e un pericapsido che deriva dalla gemmazione del virione dalla membrana cellulare e che contiene diverse glicoproteine virali che sporgono dalla superficie (Fig. 3.23a). Nel caso di HSV-1, sono almeno 11 le glicoproteine virali presenti sul pericapsido del virione, in un numero totale superiore a 1000 unità. Il virione ha un diametro complessivo che varia dai 120 ai 300 nm.



**Fig. 3.23.** HSV-1 e vettori derivati da questo virus. **a** Rappresentazione schematica della struttura dei virioni di HSV-1. **b** Organizzazione del genoma di HSV-1. Il genoma è costituito da una molecola di DNA lineare a doppio filamento di 152 kb, contenente più di 80 geni. È composto da due segmenti di lunghezza diversa, lungo e corto (*unique long*, U<sub>L</sub> e *unique short*, U<sub>S</sub>), fiancheggiati da ripetizioni invertite, chiamate TR<sub>L</sub> (ripetizione terminale del segmento lungo) e IR<sub>L</sub> (ripetizione interna del segmento lungo), e TR<sub>S</sub> e IR<sub>S</sub>. Le ripetizioni che fianleggiano U<sub>L</sub> sono designate ab e b'a', mentre quelle che fianleggiano U<sub>S</sub> a'c' e ca. Il genoma contiene due differenti origini di replicazione, ori<sub>L</sub> nel segmento lungo e ori<sub>S</sub> nel segmento corto; ori<sub>S</sub>, insieme al gene ICP4, è presente in duplice copia, dal momento che entrambi sono localizzati nelle ripetizioni invertite che fianleggiano il segmento lungo. Circa metà dei geni sono essenziali per la replicazione del virus nelle cellule in coltura (*indicati nella parte superiore dello schema*), mentre l'altra metà non lo è (*parte bassa dello schema*). I geni indicati in blu sono geni non essenziali che sono inattivati nei vettori competenti per la replicazione finora sviluppati e descritti nel testo; i geni in rosso sono geni precoci immediati (IE) che sono mutati nei virus difettivi per la replicazione. Il genoma contiene tre segnali pac (*indicati in giallo*), indispensabili per l'incapsidamento del genoma all'interno delle particelle virali

### Ciclo replicativo di HSV-1

L'infezione della cellula inizia con il legame del virus con i glicosaminocicani (GAG) della superficie cellulare, in particolare con l'eparan solfato e il dermatan solfato, legame mediato dalle glicoproteine C e B (gC e gB) esposte sul pericapside del virus. Questa iniziale interazione è seguita da un legame più specifico tra la gD e alcuni recettori di membrana, tra cui HveA (*herpes virus entry A*) – anche conosciuta come HveM –, un membro della famiglia di recettori del *tumor necrosis factor*, TNF, ed HveC (anche chiamata nectina-1), una proteina transmembrana della superfamiglia delle immunoglobuline, espressa ad alti livelli nei neuroni sensitivi. Queste interazioni portano alla fusione del pericapside virale con la membrana della cellula e all'entrata del capsido, insieme con le proteine del tegumento, all'interno del citoplasma. Il processo è mediato, con meccanismi non ancora completamente chiariti, anche dall'azione delle glicoproteine gB, gH/gL e gD.

Successivamente all'entrata nella cellula, il DNA virale viene trasportato nel nucleo, dove entra attraverso i pori nucleari e dà inizio agli eventi propri del ciclo litico. I geni virali sono espressi in maniera temporalmente regolata. Immediatamente dopo l'entrata del DNA virale nel nucleo, e in assenza di sintesi *de novo* di proteine virali, inizia la trascrizione dei 5 geni precoci immediati (IE; ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 e ICP47). I prodotti dei geni IE attivano l'espressione dei geni precoci (E), che codificano le proteine coinvolte nella replicazione del DNA virale. Quando questa è avvenuta, le proteine IE attivano la trascrizione dei geni tardivi (L). L'espressione dei geni IE è aumentata da VP16, una proteina strutturale che agisce in sinergia con molti fattori di trascrizione cellulari sui promotori dei geni IE. I prodotti dei geni L comprendono le proteine strutturali del virus, che consentono quindi l'assemblaggio di nuove particelle virali e il completamento del ciclo litico.

Durante l'infezione primaria da HSV-1, il virus si replica dapprima nelle cellule epiteliali vicino al sito di esposizione iniziale. Il virus quindi entra all'interno delle terminazioni nervose sensitive e il capsido è trasportato tramite la via del trasporto assonale retrogrado lungo il citoscheletro dell'assone fino al corpo cellulare dei neuroni dei gangli sensoriali. Una volta entrato nel nucleo di queste cellule, si instaura un'infezione latente. Questa è caratterizzata dalla presenza del genoma virale come DNA a doppio filamento circolare o sotto forma di multimeri concatemerizzati, che persistono nel nucleo in forma episomale, ovvero non integrata nel DNA della cellula ospite. In questo stato latente, tutti i geni della fase litica sono trascrizionalmente silenti, e viene unicamente espressa una famiglia di trascritti non poliadenilati denominati LAT (*latency associated transcripts*), a localizzazione nucleare. La funzione di questi RNA, che hanno una struttura simile ai *lariat*, ovvero ai prodotti che si generano durante il processamento degli introni durante lo *splicing*, non è nota; tuttavia, la loro produzione, che può persistere per l'intera vita dell'ospite, può essere utilizzata come marcatore dell'infezione virale latente.

### **Struttura e produzione dei vettori derivati da HSV-1**

Una delle maggiori limitazioni imposte dai vettori derivati da HSV-1 è legata al fatto che il virus *wild type* è altamente patogeno *in vivo*, e che la sua iniezione intracerebrale causa un'encefalite di solito fatale. Risulta quindi essenziale rimuovere gli elementi di patogenicità dal genoma virale prima di poter utilizzare il virus come vettore. Tre strategie alternative sono state seguite a questo scopo: 1) rimuovere tutti i geni che non sono indispensabili per la replicazione *in vitro* ma sono invece essenziali per la replicazione *in vivo*; questo genera dei vettori ancora competenti per la replicazione ma con virulenza attenuata (vettori competenti per la replicazione attenuati); 2) rimuovere tutti i geni che sono indispensabili per tutte le forme di replicazione (vettori difettivi per la replicazione); 3) rimuovere tutto il genoma del virus ad eccezione di un'origine di replicazione e il segnale di incapsidamento (vettori ampliconi). La costruzione e le caratteristiche di ciascuno di questi vettori sono descritte di seguito.

#### **Vettori competenti per la replicazione attenuati**

Una limitata replicazione di un vettore HSV *in vivo* può risultare utile, quale strumento per propagare il trasgene veicolato anche a cellule vicine a quelle originariamente trasdotte, amplificando quindi l'efficacia terapeutica. La delezione di alcuni geni non essenziali consente in effetti di generare mutanti di HSV che sono ancora in grado di replicarsi *in vitro*, ma la cui replicazione *in vivo* è fortemente compromessa. Tra questi sono compresi alcuni geni i cui prodotti sono coinvolti nella replicazione del DNA, nella determinazione della virulenza del virus, o nell'induzione della capacità alla cellula infettata di evadere dal sistema immunitario (Fig. 3.23b). Esempi di tali proteine sono gli enzimi timidino-chinasi (TK) e ribonucleotide reductasi (RR), due proteine indispensabili per consentire la replicazione del DNA virale nei neuroni, cellule in cui normalmente le proteine della replicazione del DNA non sono presenti; oppure il prodotto del gene *vhs* (*virion-host shut off*), che porta alla rapida destabilizzazione e al blocco della traduzione degli mRNA della cellula infettata; oppure il fattore di neurovirulenza ICP34.5, che consente la continuazione della traduzione nelle cellule infettate nonostante l'infezione attivi la chinasi cellulare PKR, che normalmente fosforila il fattore di inizio della traduzione eIF2 $\alpha$ , bloccandone l'attività quale meccanismo di difesa antivirale. Diversi studi hanno indicato che i vettori replicativi attenuati non soltanto mostrano la capacità di replicarsi autonomamente, ma, se inoculati nel cervello, sono anche in grado di circolare in regioni diverse da quelle in cui sono stati iniettati, simili in questo al virus *wild type*.

#### **Vettori ricombinanti difettivi per la replicazione**

La replicazione litica di HSV-1 nei neuroni inizia immediatamente dopo l'entrata del DNA virale nel nucleo della cellula infettata. Qui rivestono un ruolo fondamentale i prodotti dei geni IE, che prima attivano la trascrizione dei geni E, coinvolti nella replicazione del DNA virale, e poi, quando questa è avvenuta,

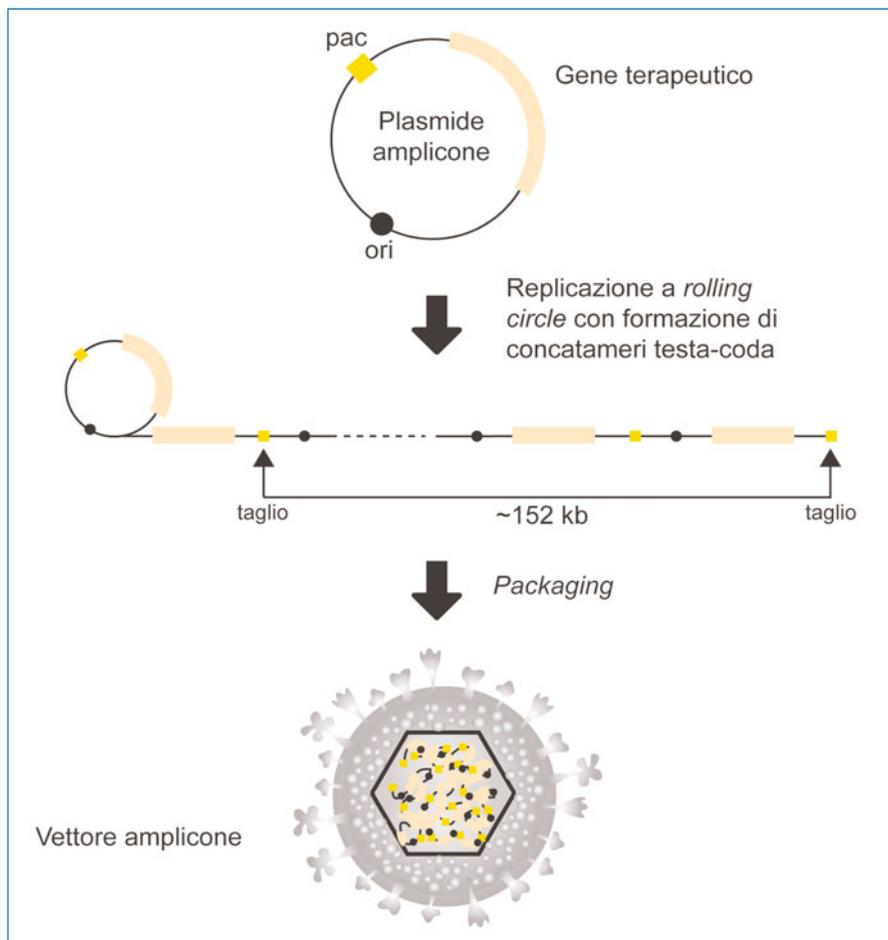
dei geni L, che codificano le proteine strutturali del virus. In particolare, la rimozione di due geni IE, ICP4 e ICP27, dal genoma virale previene la replicazione litica; i virus che portano la delezione di questi geni, quindi, sono in grado di replicarsi esclusivamente in laboratorio all'interno di cellule in cui le funzioni mancanti siano supplementare *in trans*. Quando inoculati *in vivo*, questi virus difettivi non sono in grado di attivare la cascata di eventi che porta all'infezione litica e quindi entrano in uno stato di persistenza assimilabile alla latenza virale. I vettori HSV difettivi, ottenuti secondo questo principio e solitamente recanti anche mutazioni aggiuntive in altri geni IE potenzialmente tossici per la cellula, persistono per lunghi periodi sia nei neuroni sia in cellule non-neuronali (Fig. 3.23b).

### Vettori ampliconi

I vettori ampliconi consistono di particelle virali identiche ai virioni selvatici di HSV-1, ma il cui genoma è costituito da una forma concatemerica di un plasmide (l'amplicone). Questo è costituito da un convenzionale plasmide di *E. coli* che porta un'origine di replicazione (generalmente l'origine *ori-S*) e un segnale di *packaging* (*pac* o "a"), entrambi derivati dal genoma di HSV-1 (Fig. 3.24). Le rimanenti porzioni dell'amplicone portano le sequenze trasgeniche di interesse; vista la capacità di incapsidazione dei virioni di HSV-1, queste possono avere dimensioni molto ampie, virtualmente fino a più di 150 kb. Questa dimensione rappresenta senza dubbio la massima capacità di clonazione raggiungibile con qualsiasi sistema di trasferimento genico attualmente disponibile.

La sostanziale differenza tra i vettori HSV-1 difettivi per la replicazione e gli ampliconi consiste nel fatto che questi ultimi sfruttano i virioni di HSV-1 per infettare la cellula bersaglio, ma successivamente persistono nella cellula senza esprimere alcun gene virale. Quindi, mentre i vettori difettivi per la replicazione presentano comunque un potenziale rischio di riattivazione, complementazione o ricombinazione con genomi di HSV-1 *wild type* latenti nel paziente, i vettori ampliconi sono del tutto sicuri da questo punto di vista. D'altro lato, la produzione di preparazioni ad alto titolo di ampliconi è considerevolmente più difficile di quanto lo sia quella dei vettori ricombinanti difettivi per la replicazione.

La produzione dei vettori ampliconi avveniva inizialmente in cellule trasfettate con il plasmide amplicone (prodotto nei batteri) e superinfettate con un virus *helper* HSV-1 difettivo, che forniva *in trans* tutte le proteine indispensabili per l'amplificazione e l'incapsidazione del DNA dell'amplicone nelle particelle di HSV-1. In questa maniera, tuttavia, si generavano preparazioni di vettore contaminate da virus *helper*. Più recentemente, questo problema è stato evitato mediante la co-trasfezione dell'amplicone con un set di 5 cosmidi parzialmente sovrapposti in grado di fornire *in trans* tutte le proteine del virus indispensabili per la replicazione del DNA virale e la produzione dei virioni. Questo sistema è stato ulteriormente migliorato mediante l'utilizzo di un cromosoma artificiale batterico (*bacterial artificial chromosome*, BAC) quale sorgente delle proteine virali.



**Fig. 3.24.** Vettori ampliconi derivati da HSV-1. Gli ampliconi sono plasmidi batterici che contengono una o più cassette di espressione di un trasgene e due sequenze virali non codificanti, ovvero un'origine di replicazione del DNA (*ori*) e un segnale di taglio e incapsidamento del DNA (*pac*). Dopo trasfezione in una linea cellulare che fornisce funzioni *helper* per la replicazione di HSV-1 *in trans*, l'amplicone viene replicato con un meccanismo a cerchio rotante (*rolling circle*), che genera concatameri testa-a-coda, i quali vengono incapsidati all'interno dei virioni in forma di DNA lineare di circa 152 kb

### Proprietà dei vettori derivati da HSV-1

Ciascuno dei tre tipi di vettori derivati da HSV-1 possiede caratteristiche diverse che ne guidano le possibili applicazioni nel campo della terapia genica.

Una delle principali applicazioni dei *vettori competenti per la replicazione attenuati* è in campo oncologico quali virus per la terapia oncolitica dei tumori

(vedi sezione sulla terapia genica dei tumori). Diversi virus modificati sono stati finora ottenuti a questo scopo. La prima generazione conteneva mutazioni in un singolo gene tali da limitare la replicazione virale nelle cellule in fase attiva di replicazione. In particolare, i geni considerati erano il gene TK, il gene UL39, che codifica la subunità maggiore della RR (ICP6), e il gene  $\gamma$ 34.5, che codifica il fattore di neurovirulenza ICP34.5. Mentre i primi due mutanti non sono andati oltre la sperimentazione animale a causa del rischio di tossicità, diversi mutanti alla proteina ICP34.5, che nei modelli animali hanno mostrato una considerevole efficacia antitumorale, sono attualmente in corso di sperimentazione clinica. Visto il successo di questa prima generazione di virus attenuati, si è ottenuta una seconda generazione di virus con mutazioni multiple (in particolare, ICP34.5 e ICP6, anch'esso in fase di sperimentazione clinica) e una terza generazione in cui, oltre alle delezioni dei geni sopramenzionati, i virus modificati fungono effettivamente da vettori in quanto contengono anche i geni di varie citochine (IL-4, IL-12, IL-10, GM-CSF) o della molecola co-stimolatoria B7.1, al fine di aumentare l'immunogenicità dei tumori.

Un'altra applicazione interessante dei vettori erpetici attenuati è il loro utilizzo quali vaccini vivi attenuati per l'immunizzazione contro l'infezione naturale da HSV-1. A questo fine, sono stati finora ottenuti varie combinazioni di mutanti nelle regioni che codificano le glicoproteine di superficie o i geni IE del virus, al fine di sviluppare un ceppo ideale che sia capace di replicarsi in maniera limitata, in modo da stimolare una robusta risposta immunitaria ma, al contempo, sia del tutto privo delle proprietà di neurovirulenza. La sperimentazione di questi mutanti è per ora limitata alla fase preclinica.

Infine, è interessante notare che numerosi studi hanno indicato che il tropismo di HSV-1 può essere modificato mediante la delezione o la modificazione delle glicoproteine di superficie del virus, che normalmente sono coinvolte nell'infezione. In particolare, le delezioni di gB e/o gC, la delezione di gD e la sua sostituzione con VSV-G, e la creazione di chimere tra gC e ligandi di recettori specifici può consentire alternativamente di ampliare il tropismo d'ospite o di restringerlo all'infezione di cellule che esprimono determinati recettori specifici.

I *vettori ricombinanti difettivi per la replicazione* e gli *ampliconi* sono stati invece utilizzati, finora a livello preclinico, per trasferire un'ampia varietà di geni in diversi tessuti. Nel cervello, i geni trasferiti comprendono quelli che codificano proteine con attività tossica o proapoptotica (per la terapia genica dei gliomi), neurotrofica, quali NGF o BDNF (per la terapia genica delle malattie neurodegenerative), o enzimatica, quali la tirosina idrossilasi (per la terapia genica del morbo di Parkinson). Altri studi hanno mostrato che sia i virus difettivi sia gli ampliconi possono essere utilizzati in tessuti diversi da quello nervoso, tra cui il muscolo, il cuore, il fegato, o per il trasferimento di geni con proprietà vaccinali. È prevedibile che alcuni di questi studi giungeranno alla fase di applicazione clinica nel prossimo futuro.

## Vettori virali per la terapia genica: campi di applicazione e valutazione comparativa

La Tabella 3.5 presenta una sinossi di proprietà, vantaggi e svantaggi delle cinque principali classi di vettori virali per la terapia genica. Ciascuna di esse è contraddistinta da alcune caratteristiche intrinseche, che ne indirizzano l'uso verso specifici campi di applicazione.

### Capacità di donazione

I vettori attualmente disponibili differiscono ampiamente in termini di capacità di accomodare frammenti di DNA di dimensione diversa, con uno spettro che spazia da cDNA di 3-4 kb per i vettori AAV e di 8 kb per i retrovirus, fino a giungere a frammenti di DNA genomico di 30-40 kb per i vettori adenovirali *gutless* e di 150 kb per i vettori HSV ampliconi. Nel valutare queste dimensioni, va tuttavia tenuto presente che la porzione codificante dei geni ha una dimensione media di 1,5 kb; ne consegue che anche la dimensione relativamente ridotta dell'AAV non impedisce tuttavia che i vettori da esso derivati possano essere utilizzati per veicolare un'estesa serie di geni terapeutici. La dimensione dei vettori diventa davvero limitante sostanzialmente in due situazioni specifiche, ovvero quando i cDNA da trasferire hanno effettivamente grandi dimensioni come, ad esempio, nel caso della distrofina (9.7 kb) o del Fattore VIII della coagulazione (>8 kb), o quando la trascrizione del gene terapeutico deve essere strettamente regolata, una proprietà che solitamente richiede la presenza di elementi genetici molto estesi, come, ad esempio, nel caso della terapia genica delle talassemie o del diabete. In queste situazioni, il ricorso ai vettori adenovirali *gutless* o agli ampliconi erpetici è quanto mai auspicabile. Questi ultimi, in particolare, sembrano poter accomodare interi loci genetici, composti dall'intero gene (esoni + introni) e dai suoi elementi regolatori.

### Semplicità di produzione

I sistemi di produzione delle diverse classi di vettori sono estremamente diversi. Nel caso dei vettori gammaretrovirali anfotropici ed ecotropici, la possibilità di utilizzare cellule di *packaging* rappresenta ovviamente un vantaggio rispetto ai sistemi di produzione basati sulla trasfezione transeunte. Al contrario, la produzione dei vettori AAV, dei vettori lentivirali e degli ampliconi erpetici è basata sulla trasfezione transeunte di plasmidi nelle cellule produttrici. A questo proposito, va però osservato che, anche nel caso dei vettori gammaretrovirali, l'aumento di efficienza che si ottiene utilizzando la proteina VSV-G (che non può essere espressa stabilmente) è tale da far preferire oggi un approccio transeunte. Un altro problema importante relativo alla produzione dei vettori, fondamentale ovviamente per l'utilizzo clinico, è il grado di purezza delle preparazioni virali e, in particolare, la presenza di virus *helper* all'interno di queste. Questo rappresenta

**Tabella 3.5.** Vantaggi e svantaggi dei principali vettori virali per la terapia genica

Metodo	Vantaggi	Svantaggi
Vettori basati sui gammaretrovirus	Trasduzione efficiente Integrazione nel genoma della cellula trasdotta Buona capacità di clonazione (6-8 kb)	Bassi titoli (se non pseudotipizzati) Mutagenesi inserzionale Silenziamiento dell'espressione genica Trasducono soltanto le cellule in attiva replicazione
Vettori basati sui lentivirus (HIV-1)	Trasduzione di cellule quiescenti primarie <i>in vivo</i> Integrazione nel genoma della cellula trasdotta	Bassi titoli (se non pseudotipizzati) Preoccupazioni per la sicurezza Potenziale di mutagenesi inserzionale
Vettori basati sugli adenovirus	Trasduzione molto efficiente e ad alta molteplicità Alti livelli di espressione genica Produzione di preparazioni concentrate Ampia capacità di clonazione Infezione di cellule sia in replicazione sia quiescenti Ampio spettro d'ospite	Trasduzione transeunte Stimolazione di una potente risposta infiammatoria ed immunitaria dell'ospite (vettori di prima generazione)
Vettori basati sul virus adeno-associato (AAV)	Derivato da un virus non patogeno, con un vasto spettro d'ospite Produzione di preparazioni concentrate Trasduzione ad alta molteplicità Infezione di cellule quiescenti <i>in vivo</i> Mancanza di risposta infiammatoria o immunitaria dell'ospite Espressione genica prolungata (anni)	Capacità di clonazione relativamente limitata (<5kb) Mancanza di una linea cellulare di <i>packaging</i> Tropismo limitato ad alcuni tessuti Scarsa conoscenza dei meccanismi molecolari di replicazione
Vettori basati sull'herpes simplex virus di tipo 1 (HSV-1)	Persistenza in forma latente Ampia capacità di clonazione Tropismo per le cellule neuronali	Difficili da manipolare Scarsa conoscenza delle proprietà biologiche Elementi di patogenicità difficili da eliminare

un problema molto importante quando si utilizzano gli adenovirus *gutless* o gli ampliconi erpetici prodotti con virus HSV-1 difettivo quale virus *helper*.

### **Efficienza di trasduzione**

I vettori gammaretrovirali e lentivirali, entrambi pseudotipizzati con VSV-G, sono capaci di infettare un esteso numero di tipi cellulari. Tuttavia, uno stringente requisito dei gammaretrovirus è che le cellule infettate siano in fase di attiva replicazione. Questa caratteristica ne previene sostanzialmente l'utilizzo nella maggior parte dei tessuti *in vivo*, restringendone il campo di applicazione ai sistemi *ex vivo*. Al contrario, i vettori lentivirali sono in grado di trasdurre le cellule quiescenti in maniera relativamente efficiente, in particolare quando queste cellule siano metabolicamente attive. Queste caratteristiche ne consentono l'utilizzo per il trasferimento genico nei neuroni *in vivo* ed nelle cellule staminali ematopoietiche *ex vivo*, anche in assenza di una loro pre-stimolazione. I vettori adenovirali, in virtù dell'utilizzo del recettore CAR espresso ubiquitariamente, sono invece capaci di trasdurre la grande maggioranza dei tipi cellulari sia *in vivo* che *ex vivo*. Questi vettori di fatto rappresentano il veicolo più efficiente di trasferimento genico oggi disponibile, sia dal punto di vista del numero delle cellule trasdotte sia da quello dell'efficienza di espressione del gene terapeutico. Tuttavia, la loro efficacia è limitata, nelle cellule che si replicano, dal fatto di non integrarsi e di venire quindi progressivamente diluiti o perduti durante la duplicazione cellulare. Anche i vettori AAV utilizzano recettori ubiquitari (HSPG e acido sialico) e sono quindi internalizzati dalla maggior parte delle cellule. Tuttavia, il tropismo di questi vettori è fondamentalmente dettato dagli eventi che accadono nella cellula dopo il loro ingresso, eventi che di fatto ne restringono l'utilizzo ad alcuni specifici tessuti post-mitotici, quali il muscolo scheletrico, il cuore, il cervello e la retina. I vettori AAV, quindi, rappresentano il sistema di trasferimento genico ottimale per questi tessuti. La recente identificazione di un vasto spettro di sierotipi diversi di AAV peraltro ne sta estendendo l'utilizzo anche alle patologie di altri organi, quali il fegato, il pancreas e il polmone. I vettori gammaretrovirali e lentivirali usualmente infettano le cellule a bassa molteplicità, e, nella maggior parte dei casi, soltanto un provirus si trova integrato nelle cellule trasdotte. Al contrario, i vettori adenovirali e AAV infettano ad alta molteplicità, e solitamente nelle cellule trasdotte sono riscontrabili molte copie di vettore, non integrato nel genoma cellulare.

### **Persistenza**

I diversi vettori virali differiscono ampiamente in termini di persistenza del proprio genoma nelle cellule trasdotte e di durata di espressione del gene che veicolano. Gammaretrovirus e lentivirus si integrano nel genoma della cellula, e vengono quindi ereditati permanentemente ad ogni divisione cellulare. Sono i vettori

di scelta per il trattamento di malattie ereditarie monogeniche recessive, in cui si desidera la correzione permanente di un difetto genetico. Tuttavia, soprattutto i vettori basati sui gammaretrovirus, vanno incontro ad eventi di silenziamento dell'espressione genica nel tempo: in assenza di pressione selettiva, il DNA provirale nelle cellule trasdotte viene mutilato e silenziato definitivamente. L'AAV di norma non si integra nel genoma; tuttavia, le cellule per cui mostra tropismo *in vivo* sono post-mitotiche e a lunga sopravvivenza: il virus persiste, quindi, per periodi molto prolungati, di mesi o anni; rimanendo episomale, non va incontro ad eventi di silenziamento genico e continua a mantenere l'espressione del gene terapeutico. La durata dell'efficacia dei vettori adenovirali di prima generazione è invece fortemente limitata, non dalle proprietà intrinseche del vettore, ma dall'induzione della risposta immunitaria che elimina le cellule trasdotte: solitamente, il DNA virale e quindi l'espressione del gene terapeutico non è mantenuto per più di 10-14 giorni dal momento della trasduzione. L'uso di questi vettori è quindi limitato alle situazioni in cui la persistenza dell'effetto terapeutico non sia necessaria, come, ad esempio, nella terapia genica dei tumori o nelle vaccinazioni, o non sia desiderabile, come quando si voglia esprimere transitoriamente un fattore di crescita, ad esempio per l'induzione di angiogenesi terapeutica. Infine, i vettori basati su HSV-1 risultano molto interessanti quando si voglia esprimere per tempi prolungati un gene nel cervello, in quanto sfruttano le proprietà del virus *wild type* di persistere in forma episomale nel nucleo dei neuroni per tutta la vita dell'organismo.

### **Induzione di effetti indesiderati**

L'utilizzo dei vettori virali è ancora fortemente caratterizzato dalla possibile insorgenza di eventi indesiderati o francamente patologici. I vettori adenovirali di prima generazione, come più volte ricordato, sono fortemente pro-infiammatori e inducono una potente risposta immunitaria. I vettori gammaretrovirali e, potenzialmente, quelli lentivirali possono indurre eventi di mutagenesi inserzionale. I vettori lentivirali, inoltre, come ampiamente discusso più sopra, continuano a suscitare quesiti relativi alla loro sicurezza, quesiti che peraltro sembrerebbero essere superati dalla recente introduzione dei vettori lentivirali di terza generazione. I vettori basati su HSV-1, infine, sia quelli difettivi per la replicazione sia quelli francamente oncolitici, suscitano preoccupazioni per la loro possibile riattivazione e conseguente neurovirulenza.

## **Lecture consigliate**

### **Barriere cellulari al trasferimento genico**

Conner SD, Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422:37–44  
Doherty GJ, McMahon HT (2009) Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* 78:857–902

- Nichols B (2003) Caveosomes and endocytosis of lipid rafts. *J Cell Sci* 116:4707-4714
- Plempner RK, Wolf DH (1999) Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends Biochem Sci* 24:266-270
- Sandvig K, van Deurs B (2005) Delivery into cells: lessons learned from plant and bacterial toxins. *Gene Ther* 12:865-872

## Inoculazione diretta di DNA ed RNA

- Braun S (2008) Muscular gene transfer using nonviral vectors. *Curr Gene Ther* 8:391-405
- Herweijer H, Wolff JA (2003) Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. *Gene Ther* 10:453-458

## Metodi fisici

- Andre F, Mir LM (2004) DNA electrotransfer: its principles and an updated review of its therapeutic applications. *Gene Ther* 11(Suppl 1):S33-42
- Bigey P, Bureau MF, Scherman D (2002) In vivo plasmid DNA electrotransfer. *Curr Opin Biotechnol* 13:443-447
- Frenkel V (2008) Ultrasound mediated delivery of drugs and genes to solid tumors. *Adv Drug Delivery Rev* 60:1193-1208
- Hagstrom JE (2003) Plasmid-based gene delivery to target tissues in vivo: the intravascular approach. *Curr Opin Mol Ther* 5:338-344
- Heller LC, Heller R (2006) In vivo electroporation for gene therapy. *Hum Gene Ther* 17:890-897
- Hynynen K (2008) Ultrasound for drug and gene delivery to the brain. *Adv Drug Delivery Rev* 60:1209-1217
- Newman CM, Bettinger T (2007) Gene therapy progress and prospects: ultrasound for gene transfer. *Gene Ther* 14:465-475
- Walther W, Stein U, Fichtner I et al (2001) Nonviral in vivo gene delivery into tumors using a novel low volume jet-injection technology. *Gene Ther* 8:173-180
- Wells DJ (2004) Gene therapy progress and prospects: electroporation and other physical methods. *Gene Ther* 11:1363-1369

## Metodi chimici

- Beerens AM, Al Hadithy AF, Rots MG et al (2003) Protein transduction domains and their utility in gene therapy. *Curr Gene Ther* 3:486-494
- Elouahabi A, Ruyschaert JM (2005) Formation and intracellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. *Mol Ther* 11:336-347
- Dass CR (2004) Lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: factors affecting in vivo transfection. *J Mol Med* 82:579-591
- Dincer S, Turk M, Piskin E (2005) Intelligent polymers as nonviral vectors. *Gene Ther* 12(Suppl 1):S139-45
- Duncan R, Izzo L (2005) Dendrimer biocompatibility and toxicity. *Adv Drug Delivery Rev* 57:2215-2237
- Fittipaldi A, Giacca M (2005) Transcellular protein transduction using the Tat protein of HIV-1. *Adv Drug Delivery Rev* 57:597-608

- Giacca M (2004) The HIV-1 Tat protein: a multifaceted target for novel therapeutic opportunities. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 4:277–285
- Park TG, Jeong JH, Kim SW (2006) Current status of polymeric gene delivery systems. *Adv Drug Delivery Rev* 58:467–486
- van Dillen IJ, Mulder NH, Vaalburg W et al (2002) Influence of the bystander effect on HSVtk/GCV gene therapy. A review. *Curr Gene Ther* 2:307–322
- Vile RG, Russell SJ, Lemoine NR (2000) Cancer gene therapy: hard lessons and new courses. *Gene Ther* 7:2–8
- Wasungu L, Hoekstra D (2006) Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. *J Control Release* 116:255–264
- Zuhorn IS, Engberts JB, Hoekstra D (2007) Gene delivery by cationic lipid vectors: overcoming cellular barriers. *Eur Biophys J* 36:349–362

## Vettori virali

- Alba R, Bosch A, Chillon M (2005) Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Ther* 12(Suppl 1):S18–27
- Aiken C (1997) Pseudotyping human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the glycoprotein of vesicular stomatitis virus targets HIV-1 entry to an endocytic pathway and suppresses both the requirement for Nef and the sensitivity to cyclosporin A. *J Virol* 71:5871–5877
- Argnani R, Lufino M, Manservigi M et al (2005) Replication-competent herpes simplex vectors: design and applications. *Gene Ther* 12(Suppl 1):S170–7
- Bessis N, GarciaCozar FJ, Boissier MC (2004) Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Ther* 11[Suppl 1]:S10–17
- Chang AH, Sadelain M (2007) The genetic engineering of hematopoietic stem cells: the rise of lentiviral vectors, the conundrum of the Itr, and the promise of lineage-restricted vectors. *Mol Ther* 15:445–456
- Coffin JM, Hughes H, Varmus HE (1997) *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, NY, USA
- Daniel R, Smith JA (2008) Integration site selection by retroviral vectors: molecular mechanism and clinical consequences. *Hum Gene Ther* 19:557–568
- Danthinne X, Imperiale MJ (2000) Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Ther* 7:1707–1714
- Epstein AL (2005) HSV-1-based amplicon vectors: design and applications. *Gene Ther* 12(Suppl 1):S154–8
- Kay MA, Glorioso JC, Naldini L (2001) Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med* 7:33–40
- Mueller C, Flotte TR (2008) Clinical gene therapy using recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther* 15:858–863
- Schambach A, Baum C (2008) Clinical application of lentiviral vectors: concepts and practice. *Curr Gene Ther* 8:474–482
- Sinn PL, Sauter SL, McCray PB Jr. (2005) Gene therapy progress and prospects: development of improved lentiviral and retroviral vectors—design, biosafety, and production. *Gene Ther* 12:1089–1098
- St George JA (2003) Gene therapy progress and prospects: adenoviral vectors. *Gene Ther* 10:1135–1141
- Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA (2003) Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 4:346–358
- Wu Z, Asokan A, Samulski RJ (2006) Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther* 14:316–327

Zentilin L, Giacca M (2008) Adeno-associated virus vectors: versatile tools for in vivo gene transfer. *Contrib Nephrol* 159:63–77

Zufferey R, Dull T, Mandel RJ et al (1998) Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* 72:9873-9880