

## **INTERVISTA AL PROF. STEFANO RIVELLA**

### **Quali sono le caratteristiche principali del vostro vettore?**

Il nostro vettore è il più recente sistema scoperto e utilizzato per il trasferimento genico e deriva dallo studio del virus HIV, che appartiene alla famiglia dei Lentivirus. L'utilizzo dei vettori lentivirali ha creato nuove prospettive nel campo della terapia genica. Questi vettori possiedono due caratteristiche fondamentali che li distinguono dai vettori più tradizionali: in primo luogo sono in grado di infettare e trasferire il gene terapeutico, con alta efficienza, in cellule staminali ematopoietiche. In secondo luogo sono in grado di trasportare ed integrare fedelmente, nel genoma delle cellule trasdotte, ampie regioni genomiche, essenziali per esprimere correttamente ed in maniera tessuto-specifica il gene terapeutico.

### **Quanta sequenza genomica, corrispondente al gene della $\beta$ -globina umana, il vettore è in grado di trasferire alle cellule staminali ematopoietiche?**

Il gene che codifica per la catena  $\beta$  dell'emoglobina è stato il primo gene umano clonato e caratterizzato. Da allora numerose mutazioni che riducono o aboliscono la sua espressione sono state identificate e associate al fenotipo talassemico. Come riconciliare il fatto che, nonostante il gene della  $\beta$ -globina sia stato il primo gene umano clonato e intensamente studiato, non si sia ancora arrivati ad una cura definitiva per la  $\beta$ -talassemia? Per fare un'analogia, possiamo immaginare che la produzione e la regolazione del gene della globina sia controllata da un computer. Ebbene, la produzione della proteina richiede oltre al gene (che potremmo definire l'hardware del computer), sequenze genomiche regolatrici (software) che occupano la quasi totalità della memoria del computer. Per lungo tempo la difficoltà è consistita nell'identificare un vettore (computer) che fosse in grado di contenere, oltre al gene (hardware), le sequenze genomiche (software) per regolare l'espressione e la produzione del gene stesso ad alti livelli e nelle cellule eritroidi. Negli ultimi anni, abbiamo scoperto che solo i vettori lentivirali avevano questa "capacità" di memoria. In questo modo abbiamo costruito il primo vettore lentivirale (chiamato TNS9) con il gene della  $\beta$ -globina umana e potuto inserire anche parte delle istruzioni o "software" (sequenze genomiche accessorie) per produrre alti livelli di catene  $\beta$  solo nelle cellule eritroidi.

### **In quali tipi di cellule riesce a integrarsi?**

La cellula ematopoietica staminale è "la madre" di tutte le cellule del nostro sangue: eritrociti, ma anche linfociti, granulociti, piastrine, ecc., ed è l'unica cellula che non ha una "data di scadenza", al contrario delle altre cellule ematopoietiche (ad eccezione di alcune cellule del nostro sistema immunitario, ma che non esprimono la globina). Il gene della beta-globina deve, quindi, essere inserito nelle cellule ematopoietiche staminali. Immaginiamo di inserire una nuova copia del gene della  $\beta$ -globina (transgene) nelle cellule ematopoietiche: tutte le sue cellule "figlie" porteranno con loro una copia del transgene e quelle che diventeranno eritrociti esprimeranno la globina.

### **Qual è la percentuale di integrazione?**

Dipende dal sistema biologico che si utilizza. Avendo molta più esperienza con le cellule ematopoietiche staminali murine, l'integrazione è ottimale e può raggiungere il 100%

delle cellule staminali. Nel nostro caso, il vettore TNS9 ha mostrato un rapporto lineare tra il numero di integrazioni e la quantità di emoglobina prodotta. Nel mio laboratorio la Dr.ssa Laura Breda, in collaborazione con la Dr.ssa Katerina Politi della Columbia University, sta sviluppando un nuovo filone di ricerca per quantificare, direttamente, il rapporto tra integrazione, espressione del transgene, quantità di emoglobina prodotta e correzione dell'anemia. Per quanto riguarda le cellule umane abbiamo meno esperienza e dobbiamo ancora trovare le condizioni finali per ottenere i valori osservati nel topo. In esperimenti in cellule umane osserviamo ancora una minore efficienza di integrazione rispetto al topo. Ma credo che sia soltanto questione di investimenti e di tempo.

**Quale percentuale di cellule che esprimono il transgene è necessaria per il trattamento di terapia genica nel topo?**

Nella nostra recente pubblicazione (sul secondo numero di aprile della rivista Blood: 15 April 2003; Vol. 101, No. 8, pp. 2932-2939) abbiamo dimostrato che topi affetti da beta talassemia major, dopo trattamento con il nostro vettore, riescono ad esprimere tra i 5 e i 12 g/dL di emoglobina, con valori d'integrazione di 1.5-3 copie per cellula. Questo valore è una media, poiché non abbiamo studiato l'integrazione in singole cellule. Non sappiamo ancora quante cellule, in totale, hanno ricevuto il vettore. Come detto precedentemente, nel mio laboratorio la Dr. Laura Breda sta sviluppando un nuovo vettore e una nuova tecnologia per rispondere a queste domande fondamentali per avere una quadro definitivo sul valore terapeutico di TNS9.

**Quali sono i principali parametri per dire che il trattamento di terapia genica è riuscito?**

Inizialmente mi limiterò ad utilizzare i dati sviluppati negli esperimenti con il sistema animale murino. In tutti gli animali affetti da beta talassemia major il vettore ha permesso, senza trasfusione, di raggiungere valori di emoglobina da zero a 5-12 g/dL. Per questo motivo non credo che si possa dire che questo esperimento sia conclusivo. Il nostro scopo finale è di scoprire come ottenere "sempre" i 12g/dL o valori anche più alti di emoglobina. Spero che i nostri futuri dati ci diano questa risposta. Per quanto riguarda l'uomo, il giorno che riusciremo ad ottenere costantemente questi valori di produzione di emoglobina potremo dire di essere riusciti nel nostro scopo.

**E' necessario un solo trattamento per trasformare il topo in un animale normale?**

Si, è sufficiente un solo trattamento con il vettore. Come detto precedentemente, i valori ottenuti variano da topo a topo.

**Ci può descrivere brevemente tutte le fasi di terapia genica: dalla preparazione del topo al trattamento ed al successivo follow-up.**

La prima fase è consistita nel riuscire a fare produrre la proteina  $\beta$  nelle cellule eritroidi (e quindi negli eritrociti) in alta quantità e, contemporaneamente, impedire che la proteina venisse prodotta in cellule del sangue di altro tipo, come per esempio i linfociti. Questa regolazione viene definita "tessuto specifica". E' facilmente immaginabile che se il gene della  $\beta$ -globina venisse espresso in cellule non eritroidi, queste verrebbero danneggiate irreparabilmente. Per esempio, la formazione di linfociti o di piastrine potrebbe essere impedita dalla presenza di catene  $\beta$  dell'emoglobina. Questo porterebbe, rispettivamente,

a gravi forme di immunodeficienza o di trombocitopenia. Per questo motivo abbiamo costruito il vettore TNS9, inserendo al suo interno il gene della beta globina e mantenendo il più possibile la struttura genomica “originale”.

A questo punto il vettore deve essere “prodotto”. Sfortunatamente questo passaggio richiede circa un mese e non è ancora molto efficiente. Da una buona preparazione si possono “curare” dai due ai quattro topi. Uno dei nostri progetti consiste nell’investigare nuovi sistemi di produzione del vettore, allo scopo di ‘accorciare i tempi e abbassare i costi”.

Il vettore prodotto, quindi, è stato utilizzato in un modello murino affetto da  $\beta$ -talassemia intermedia. In questo modello murino i geni della  $\beta$ -globina sono deleti su un cromosoma, e i topi mostrano caratteristiche ematologiche caratteristiche della  $\beta$ -talassemia intermedia nell’uomo: anemia (7-8 g/dL di emoglobina rispetto ai 13-15g/dL in topi normali); alta percentuale di reticolociti, splenomegalia e alti depositi di ferro negli organi analizzati (milza, fegato e midollo). Questi topi sono molto fragili e devono essere costantemente tenuti sotto “osservazione” nella migliore “animal facility” (che equivale, in termini economici, a ospitare un turista, per mesi, al Plaza!!). Inoltre bisogna farli riprodurre per mantenere la loro colonia e poter valutare l’efficacia del vettore.

Per fare ciò abbiamo trapiantato cellule ematopoietiche staminali infettate con TNS9 (trasdotte) in topi affetti da  $\beta$ -talassemia intermedia. Questa procedura si definisce trapianto di midollo autologo modificato geneticamente. Il trapianto autologo, a differenza di quello eterologo, consiste nell’usare, per il trapianto, le cellule del paziente stesso. In questo modo si prevengono complicazioni di tipo immunitario (come il rigetto del midollo o la GVHD: graft versus host disease o reazione del trapianto verso l'ospite). In questi topi abbiamo osservato un netto miglioramento del fenotipo talassemico, con innalzamento del livello dell’ emoglobina da 7-8 g/dL a 11-13 g/dL, assenza di splenomegalia e deposizione di ferro. I topi devono essere seguiti per parecchi mesi (fino a due anni), per essere sicuri che il miglioramento non sia temporaneo, ma definitivo (la vita media di un topo è di circa due anni). I topi devono essere analizzati almeno ogni mese: esami del sangue, numero di copie del vettore, livello di espressione del gene, proteina prodotta.

Successivamente, allo scopo di verificare le potenzialità di TNS9 in una grave forma di talassemia, abbiamo generato un nuovo modello murino affetto da  $\beta$ -talassemia major. Siccome nel topo i geni corrispondenti alle catene  $\gamma$  della globina (emoglobina fetale) non sono presenti, il passaggio dalla produzione dell’emoglobina embrionale a quella adulta avviene in utero. Per questo motivo topi in cui i geni della  $\beta$ -globina sono deleti muoiono alla nascita, e animali adulti affetti da  $\beta$ -talassemia major non sono disponibili. Allo scopo di generare il nostro modello murino di talassemia major, abbiamo isolato cellule fetali ematopoietiche staminali da embrioni affetti da talassemia major e trapiantato le stesse in topi adulti normali dopo mieloablazione del loro midollo osseo (cioè eliminazione, tramite irradiazione, delle cellule ematopoietiche endogene).

Questi topi hanno ripopolato il loro midollo con le cellule ematopoietiche staminali derivanti dagli embrioni affetti da  $\beta$ -talassemia major, e hanno sviluppato una severa forma di talassemia che li ha portati, in 6-8 settimane dal trapianto, a livelli di emoglobina pari a 2-3 g/dL, splenomegalia e accumulo di ferro nel fegato, milza e midollo.

Abbiamo quindi ripetuto l'esperimento utilizzando il vettore TNS9. Animali generati con questo protocollo sono sopravvissuti al trapianto di midollo e hanno mostrato produzione di alti livelli della catena  $\beta$  dell'emoglobina umana. In particolare, alcuni di questi animali (n=6) hanno mostrato, dopo due-tre mesi dal trapianto, esclusiva produzione di emoglobina chimerica (il tetramero di emoglobina formato da due catene  $\alpha$  di topo e due catene  $\beta$  umane =  $\alpha_2\text{:h}\beta_2$ ) e valori di emoglobina nell'intervallo di 5-12g/dL.

Questa osservazione dimostra che la proteina della  $\beta$ -globina umana prodotta dal vettore TNS9 è in grado di recuperare il difetto genetico dovuto alla delezione dei geni della  $\beta$ -globina di topo. Questi topi sono stati analizzati per un periodo di tempo corrispondente a 4-8 mesi dal trapianto.

#### **Qual è il grado di sicurezza dei vettori utilizzati soprattutto nel lungo periodo?**

Nei topi non si sono manifestati effetti "collaterali", anche dopo due anni dal trapianto. Analisi più approfondite e identificazione dei siti d'inserzione del vettore nel genoma delle cellule trasdotte, soprattutto in primati, potrà darci una risposta definitiva.

#### **Questi vettori sono stati già utilizzati nei primati o nell'uomo?**

Per quanto riguarda i primati, alcuni vettori lentivirali che non contengono nessun gene terapeutico sono stati usati e nessun effetto collaterale è stato osservato. Per quanto riguarda l'uomo, nessun vettore lentivirale è mai stato utilizzato, neanche in protocolli clinici sperimentali.

#### **Sarà possibile curare tutte le forme di talassemia?**

La  $\beta$ -talassemia è causata dalla riduzione o mancata produzione della catena  $\beta$  dell'emoglobina adulta, la quale è costituita da catene proteiche chiamate  $\alpha$  e  $\beta$ . Quindi, in tutti i casi di  $\beta$ -talassemia, ovvero quando una mutazione nel locus del gene della beta globina riduce la produzione di emoglobina, il vettore TNS9 ha la potenzialità di curare questa malattia.

#### **Quali sono al momento i principali problemi che devono ancora essere superati per arrivare ad una sperimentazione clinica? Cosa manca a questo punto per arrivare ad un test clinico? Quali sono le prospettive di impiego di questi vettori nell'uomo?**

Innanzitutto bisogna aumentare la produzione del vettore. La preparazione del vettore richiede molto tempo e un grosso sforzo economico. Mentre l'attuale produzione del vettore non deve essere rallentata, altre metodiche devono essere sperimentate allo scopo di rendere al più presto il vettore accessibile (dal punto di vista quantitativo ed economico) a tutti.

Inoltre, nonostante il nostro vettore abbia delle fortissime potenzialità, è necessario inserire in TNS9 una sequenza isolatrice. I vettori come TNS9, pur essendo capaci di integrare il gene terapeutico nelle cellule staminali ematopoietiche, lo possono inserire in qualsiasi regione del genoma. In altre parole, il nuovo gene potrebbe trovarsi nelle vicinanze di un altro gene o sequenza regolativa, che potrebbero modificare l'espressione del gene globinico terapeutico. Ovviamente anche la situazione opposta si potrebbe verificare, e in questo caso le sequenze regolative del gene globinico potrebbero alterare l'espressione di un gene nelle vicinanze del sito di integrazione (mutagenesi inserzionale). Le sequenze isolatrici hanno la proprietà di separare elementi genomici adiacenti quando si trovano interposti fra loro. In pratica queste sequenze hanno la proprietà di isolare la funzione del vettore dai geni che potenzialmente si potrebbero trovare in vicinanza del sito di integrazione. L'uso di una sequenza isolatrice è di rendere più riproducibile il livello di espressione da un sito di integrazione all'altro e ridurre il rischio di mutagenesi inserzionale.

Infine bisogna trovare le corrette condizioni per ottenere l'inserimento del gene terapeutico in un altissimo numero di cellule ematopoietiche del paziente. Se questo oggi è possibile in cellule murine è perché abbiamo potuto accumulare lunghi anni di esperienza in questo modello animale. Adesso che abbiamo un vettore efficace dobbiamo trovare le perfette condizioni per riprodurre gli stessi risultati in cellule umane e identificare il numero minimo di cellule umane staminali che dovranno contenere il vettore per curare l'anemia nei pazienti. Inoltre sarà necessario sottoporre il vettore a stringenti test di sicurezza. Per ottenere questi scopi uno studio su animali superiori (primati) deve essere completato.

In conclusione, i prossimi studi saranno finalizzati a perfezionare la produzione del vettore e a completare i test di sicurezza. Credo che la potenzialità terapeutica di TNS9 sia indiscutibile. I prossimi anni dovranno essere spesi per garantire che il vettore TNS9 possa diventare una realtà terapeutica accessibile a tutti i pazienti.

### **Quali sono i laboratori nel mondo impegnati in questa ricerca?**

Attualmente ci sono diversi laboratori che si occupano di emoglobinopatie. A questo punto elencarli tutti sarebbe alquanto tedioso. In ogni caso questi laboratori hanno sicuramente preso spunto dalla nostra ricerca e utilizzano le tecnologie che noi abbiamo pubblicato in questi anni su Nature, Blood e altre riviste scientifiche. I gruppi che hanno utilizzato al meglio questi dati sono quelli che fanno riferimento a Philippe Leboulch e a Arthur Nienhuis.

### **Se il suo laboratorio avesse a disposizione maggiori risorse umane e finanziarie si potrebbe arrivare ad un risultato clinico in tempi relativamente brevi?**

E' indiscutibile che una maggior disponibilità finanziaria non può che accelerare i progressi in questo campo. Inoltre, penso che le risorse "umane" siano molto importanti per il completamento di questo progetto. E non mi riferisco solo alla pura "forza lavoro", ma anche all'attività di persone motivate che hanno, come ultimo fine, la guarigione di questa malattia. Ho avuto occasione di conoscerne molte all'interno dell'Associazione veneta per la lotta alla talassemia di Rovigo. Questa Associazione, che ha contribuito alla

nascita e allo sviluppo del Thal-Lab di Ferrara, ha anche sponsorizzato una giovane promettente ricercatrice italiana (la Dr.ssa Laura Breda) che si è formata nel laboratorio del Professor Gambari, docente dell'Università estense e Direttore dello stesso Thal-Lab. La speranza è che Laura ci permetta di stabilire una proficua e duratura collaborazione con il gruppo del Professor Gambari.

Questa iniziativa si identifica completamente con la mia linea di pensiero: la collaborazione e la condivisione dei dati scientifici è fondamentale per raggiungere dei risultati di valore e in tempi più brevi. E' con lo stesso spirito che continuo a collaborare con il Dr. Sadelain e ad aprirmi a nuovi ricercatori. Sicuramente siamo alla ricerca di finanziamenti che ci permettano di assumere nuove leve che abbiano le qualità e lo spirito necessario per affrontare questa "sfida". E, nello stesso tempo, che vogliano crescere imparando le nuove tecnologie che abbiamo a disposizione. E' con questa filosofia che stiamo stabilendo nuove interazioni, per esempio con la "Fondazione Giambone per la Guarigione dalla Talassaemia" di Sassari.

**Vuol descrivere ai lettori di EX il luogo in cui lavora?**

Mi considero una persona fortunata. Mi hanno dato la possibilità di aprire un laboratorio alla prestigiosa Weill Medical College dell'Università Cornell, che è situata fra il Memorial Sloan-Kettering, la Rockefeller University, il New York Hospital e il New York Blood Center. La Dottoressa Patricia Giardina, il Capo del Dipartimento dove lavoro, ha dedicato tutta la sua vita ai pazienti talassemici e dirige il centro trasfusionale più grande degli Stati Uniti sulla East Cost. Il laboratorio è nuovo, così come l'edificio che lo ospita. L'housing facility ("l'hotel" dei topi) si trova nello stesso edificio, ma ad un piano diverso. Interagisco con alcuni fra gli scienziati più famosi al mondo (Dr. Sadelain, Dr. Rafii, Dr. Lyden, Dr. Mohandas) e sono ben felice di collaborare con loro così come con il gruppo del Professor Gambari in Ferrara, il Dr. Luzzatto a Genova e il Dr. Rachmilewitz e il Dr. Fibach in Israele. Credo sia molto importante interagire con altri laboratori ed esperti. Come si dice: l'unione fa la forza e...fa raggiungere più velocemente i risultati che tanto aspettiamo.

*(l'intervista è stata pubblicata nel periodico "EX" di Ravenna, n. 3, aprile 2003)*