

# Una terapia genica per l'anemia a cellule falciformi è disponibile, ma molto costosa

di Maurizio Brunori

*Combinando le potenzialità del metodo CRISPR/Cas9 con una strategia mirata ed efficace si possono guarire gravi malattie ereditarie. Progressi ulteriori si richiedono per una maggiore accessibilità delle terapie*

Nel novembre del 1949 il grande chimico Linus Pauling, Professore al CALTECH di Pasadena, pubblicò su Science un fondamentale lavoro proponendo il concetto di malattia molecolare (Pauling L et al, 1949, Science, 110, 543). Interessato alle basi molecolari dell'anemia emolitica ereditaria detta a cellule falciformi, Pauling scoprì che la causa della malattia era una mutazione dell'emoglobina (HbA), la proteina contenuta nei globuli rossi (GR) del sangue costituita da 4 catene proteiche due  $\alpha$  e due  $\beta$ , la cui funzione è il trasporto dell'ossigeno dai polmoni ai tessuti. La mutazione di un aminoacido della catena  $\beta$  ( $\beta^6$  Glu/Val) causa l'aggregazione del mutante (indicato come HbS) e conseguentemente la deformazione del GR che assume la forma di una falce, da cui il nome della malattia. L'aggregazione viene innescata nei piccoli vasi sanguigni detti capillari dove l'emoglobina cede l'ossigeno ai tessuti e cambia la sua struttura tridimensionale; i GR deformati essendo rigidi, bloccano il flusso del sangue nei piccoli vasi causando crisi dolorose e distruzione delle cellule con conseguente progressiva anemia. Nel 2015 i portatori del gene mutato per HbS erano globalmente oltre 4.5 milioni e i decessi circa 115.000, in maggioranza in Africa, in Asia occidentale e fra gli afro-americani (circa 100.000 malati).

Un'altra grave patologia ereditaria del sangue è la talassemia causata da uno squilibrio nella sintesi dei due differenti tipi di catene proteiche; causa della  $\alpha$  talassemia o della  $\beta$  talassemia. Questo squilibrio induce una seria instabilità della catena proteica orfana del partner con effetti devastanti sui GR e

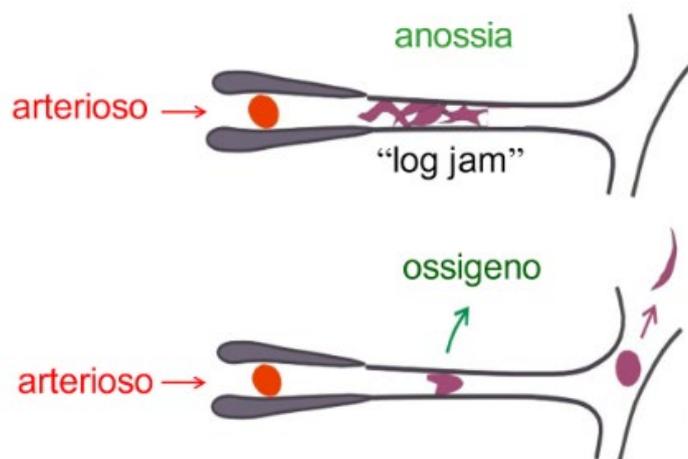
conseguentemente grave anemia. Una rassegna sulle talassemie è stata pubblicata nel 2022 dal socio linceo Paolo Ascenzi et coll (Mol Asp Med, 84, 101028). La talassemia è presente nelle popolazioni rivierasche del Mediterraneo (da cui l'etimologia) ma comunque molto diffusa; nel mondo gli individui portatori del gene della  $\beta$ -talassemia sono circa 90 milioni, e i malati circa 400.000, di cui 6.000 in Italia. Ambedue queste emoglobinopatie sono dovute a mutazioni recessive. La congruenza geografica globale fra la presenza di queste anemie emolitiche ereditarie e la diffusione della malaria ha indotto a ipotizzare che le alterazioni genetiche causali siano associate a un possibile meccanismo di difesa dal Plasmodium; ipotesi suggestiva e condivisa da moltissimi ma ancora criticata da alcuni.



Immagine al microscopio ottico di 3 globuli rossi normali a forma di disco biconcavo, e di un GR deformato a falce per aggregazione della HbS deossigenata.

A 75 anni dalla scoperta della HbS i pazienti con anemia a cellule falciformi devono essere ospedalizzati in emergenza e curati, per così dire, con trasfusioni di sangue. L'emoglobina dell'adulto (HbA) con due catene  $\alpha$  e due  $\beta$  ( $\alpha_2\beta_2$ ), non è sintetizzata durante la vita fetale quando l'organismo produce l'emoglobina fetale nella quale le catene  $\beta$  sono sostituite dalle catene  $\gamma$  (HbF,  $\alpha_2\gamma_2$ ). Solo dopo la nascita inizia la sintesi dell'emoglobina dell'adulto e contemporaneamente viene soppressa la sintesi dell'emoglobina fetale perché il gene della catena  $\gamma$  viene "spento" dal legame con un repressore specifico (detto BCL11A) come scoperto da Swee et al. (Nature Genetics, 2007). È interessante notare che Orah Platt di Harvard aveva osservato che i portatori di HbS più longevi mostravano di avere nel GR un contenuto di emoglobina fetale (HbF) superiore al 7%. Inoltre era noto che in alcune popolazioni dell'Arabia individui omozigoti per la HbS con un'alta percentuale di HbF (circa 15%) non hanno crisi da vaso-occlusione. Nel 1998 la Food and Drug Administration (USA) approvò l'utilizzazione di idrossiurea per i portatori di

HbS, considerati alcuni risultati positivi quali la riduzione nel numero di crisi dolorose e della lisi dei GR, e conseguentemente una riduzione nel numero di trasfusioni. Uno studio epidemiologico condotto da Samuel Charache (Baltimora, MD) dimostrò che l'effetto positivo del trattamento con idrossiurea era da attribuire principalmente alla presenza nei globuli rossi di emoglobina fetale (HbF). Ma come spiegare l'effetto benefico della HbF se non assumendo che la sua presenza nel GR potrebbe ostacolare il processo di aggregazione? Il meccanismo coinvolto nella protezione da HbF è stato chiarito grazie a sofisticati studi di Biochimica e Biofisica.



La sequenza degli eventi che conducono alla rapida deformazione a falce dei GR. Durante il transito nel capillare (circa 1sec) il GR cede l'ossigeno ai tessuti e la HbS aggrega formando fibrille che deformano la cellula e bloccano il flusso sanguigno "log jam" (Con il permesso di WA Eaton, NIH, Bethesda, MD, USA)

L'aggregazione del mutante HbS desossigenato è una reazione complessa che si innesca dopo una fase di ritardo la cui durata è funzione della concentrazione intracellulare della HbS, come scoperto da WA Eaton (Amer J Hematol 95: 205, 2020). Quando nel GR è presente anche HbF che non aggrega, la diluizione relativa della HbS tende a rallentare l'aggregazione e il GR potrebbe sfuggire dal capillare prima della falcizzazione. In questo caso il blocco del flusso sanguigno e conseguentemente la crisi dolorosa e la necrosi dei tessuti a valle del blocco sarebbero evitati. È ovvio che se fosse possibile interferire con il legame del repressore BCL11A al gene della catena  $\gamma$  e per questa via riattivare nell'adulto la sintesi di HbF, l'aggregazione intracellulare

della HbS sarebbe rallentata e la deformazione del GR sarebbe dilazionata o addirittura annullata. In aggiunta una procedura che potesse riattivare l'espressione del gene della catena proteica  $\gamma$  e consentire la sintesi di sufficienti quantità di HbF (>50%) sarebbe un passo risolutivo per la cura della talassemia.



La formazione delle fibrille di HbS (priva di ossigeno) che determina la deformazione a falce del GR segue l'innesco con un certo ritardo, vedi freccia, ritardo necessario per formare i nuclei primario e secondario. Il tempo di ritardo è funzione della concentrazione intracellulare dell'HbS, ed è ovviamente molto più breve a concentrazione alta (curva in rosso) e molto più lungo a concentrazione bassa (curva nera). (Con il permesso di WA Eaton, NIH, Bethesda, MD, USA).

Negli ultimi venti anni nuove metodologie di genome editing altamente efficaci hanno consentito straordinari successi nella cura di queste gravi malattie del sangue, grazie alla disponibilità della tecnologia CRISPR/Cas9 scoperta da Emmanuelle Charpentier e Jennifer Doudna, vincitrici nel 2020 del Premio Nobel. Di fatto una nota pubblicata nel giugno 2020 su HuffPost illustrava i primi risultati positivi ottenuti da Crispr Therapeutics e Vertex Pharmaceuticals nel trattamento di volontari malati di anemia a cellule falciformi o di talassemia. La manipolazione genetica era mirata a rimuovere il blocco della sintesi della HbF nelle cellule staminali ematopoietiche del paziente. La sperimentazione clinica allora presentata dal dott. Selim Gorbacioglu al European Hematology Congress (2020) riguardava

complessivamente 5 volontari affetti da  $\beta$  talassemia e 2 volontari affetti da anemia a cellule falciformi. Victoria Gray, una signora di 34 anni madre di 4 figli e gravemente malata per anemia a cellule falciformi, è stata la prima volontaria al mondo a ricevere nel 2019 il trapianto delle sue cellule staminali geneticamente modificate. Prima del trattamento la Gray era ricoverata in emergenza ogni mese e trattenuta per più di una settimana per trasfusioni. Dopo un breve periodo dal trapianto iniziò la sintesi di HbF in notevoli quantità, scomparvero progressivamente le crisi vaso-occlusive e iniziò una vita quasi normale senza necessità di trasfusioni. La procedura di ingegneria cellulare messa a punto consiste (i) nell'isolamento dal sangue del paziente di cellule staminali ematopoietiche capaci di produrre tutte le cellule del sangue compresi ovviamente i GR; (ii) nella modifica del genoma utilizzando la tecnologia di genome editing basata su CRISPR/Cas9 per modificare il repressore che blocca l'espressione delle catene  $\gamma$  e quindi consentire la neo-sintesi di HbF ad alti livelli. In tutti i primi 7 volontari le cellule staminali ematopoietiche ingegnerizzate colonizzarono il midollo osseo con sintesi di livelli sostanziali di HbF (dal 50% al 90%).

Le ricerche riguardanti le terapie geniche per la cura di queste anemie emolitiche hanno registrato negli ultimi anni ulteriori progressi, tanto che a dicembre 2023 la FDA (Food and Drug Administration, USA) ha approvato l'uso di due terapie geniche denominate: (i) CASGEVY prodotta da Vertex Pharmaceuticals e CRISPR-Therapeutics, e (ii) LYFGENIA prodotta da Bluebird.Bio's lovo-cel. Per produrre CASGEVY il bersaglio dell'editing tramite CRISPR/Cas9 è stato il repressore del gene dell'emoglobina fetale ([BCL11A](#)) in modo da resuscitare la sintesi di HbF nei GR contenenti HbS. LYFGENIA utilizza una differente strategia basata su un vettore virale per introdurre nelle cellule staminali del paziente un gene della catena  $\beta$  opportunamente modificato in modo da produrre un'emoglobina mutata (HbAT87Q) che interferisce con l'aggregazione della HbS. I 36 pazienti arruolati per questo studio, hanno risposto positivamente senza crisi vaso-occlusive per almeno due anni dopo il trapianto.

Questo grande successo della biologia molecolare e della biochimica cellulare dimostra che combinando le potenzialità del metodo CRISPR/Cas9 con una strategia mirata ed efficace si possono guarire gravi malattie ereditarie. Come accennato, le procedure sono molto sofisticate e la complessità richiede ospedalizzazione in strutture di alto profilo con costi molto elevati. Le

valutazioni dell'Institute for Clinical and Economic Review prevedono per CASGEVY un costo intorno a \$ 1,9 milioni e per LYFGENIA circa \$ 2.2 milioni. Costi complessivi altissimi per curare i circa 100.000 pazienti USA, e assolutamente proibitivi per i milioni di potenziali malati nel mondo intero. L'enormità del costo per queste terapie geniche ha stimolato alcuni ricercatori illuminati a tentare di identificare metodi alternativi per la cura di queste anemie emolitiche. William Eaton del NIH, USA e Socio dell'Accademia Nazionale dei Lincei, è fortemente impegnato da molti anni per identificare uno o più composti chimici fra i tanti già disponibili che possano alleviare in modo efficace le conseguenze più critiche e dolorose dell'anemia a cellule falciformi. La strategia prevede la somministrazione per via orale di una molecola che abbia l'effetto di allungare il tempo di latenza che precede la formazione dei nuclei di HbS, primo passo per l'aggregazione che conduce alla deformazione del GR. Secondo la teoria cinetica di cui sopra un allungamento del tempo di ritardo di due/quattro volte eviterebbe la formazione delle fibrille nei piccoli vasi sanguigni riducendo il numero di crisi vaso-occlusive. Un farmaco economico, somministrabile per via orale e facilmente distribuibile sarebbe un contributo risolutivo alla lotta contro le anemie emolitiche ereditarie in tutto il mondo.

Articolo pubblicato il 23 febbraio 2024 su

<https://www.huffingtonpost.it/guest/accademia-dei-lincei/>