

Dall'editing genomico speranze per i malati di anemie emolitiche (di M. Brunori)

(A cura di Maurizio Brunori, Prof. emerito di Chimica e Biochimica, Sapienza Università di Roma; presidente emerito della Classe di Scienze FMN dell'Accademia dei Lincei)

Il dott. Selim Gorbacioglu, professore di pediatria ed ematologia all'Ospedale universitario di Regensburg, ha comunicato nel corso della riunione virtuale del European Hematology Congress (EHC) i risultati clinici ottenuti nell'ambito di un programma di ricerca della Crispr Therapeutics e Vertex Pharmaceuticals volto a curare i portatori di due gravi malattie genetiche del sangue che globalmente colpiscono da decine a centinaia di milioni di persone, e cioè la talassemia o anemia mediterranea, e l'anemia a cellule falciformi. Queste gravi malattie sono causate da alterazioni dell'emoglobina (HbA), proteina contenuta nei globuli rossi del sangue deputata al trasporto dell'ossigeno dai polmoni ai tessuti (*Antonini E., Brunori M. 1971, Hemoglobin and myoglobin, North Holland, London*).

L'emoglobina è costituita da quattro catene proteiche uguali a due a due (formula convenzionale: $\alpha_2\beta_2$). Per la stabilità e il corretto funzionamento dell'emoglobina è necessario che le cellule staminali ematopoietiche sintetizzino quantità uguali delle globine α e β .

La talassemia è conseguenza di una delezione o alterazione puntiforme dei geni delle globine, che determina uno squilibrio nella sintesi dei due tipi di catene proteiche con carenza dell'una o dell'altra (α talassemia oppure la forma più grave β talassemia). La grossolana alterazione strutturale si associa a instabilità delle catene orfane del partner, con effetti devastanti sui globuli rossi e conseguentemente grave anemia.

L'anemia a cellule falciformi (Sickle Cell Anemia) è caratterizzata da crisi dolorose dovute a frequenti (es. 5 all'anno) fenomeni vaso-occlusivi e anemia conclamata. Nel 1949 Linus Pauling, Premio Nobel per la Chimica, dimostrò che la causa di questa patologia è una mutazione puntiforme dell'emoglobina (chiamata HbS) (Pauling L et al, 1949, Science, 110, 543). La sostituzione di un solo aminoacido della catena β potrebbe sembrare un evento di minore importanza, ma in realtà è la causa di una marcata tendenza della HbS ad

aggregare (quando nello stato desossigenato), con deformazione dei globuli rossi e perdita di flessibilità.

Queste emoglobinopatie sono presenti in moltissimi paesi. La talassemia è diffusa nelle popolazioni rivierasche del Mediterraneo (da cui l'etimologia), ma non solo. L'anemia a cellule falciformi colpisce soprattutto le popolazioni dell'Africa ed è pertanto presente anche negli Usa (circa 100,000 casi). Un'analisi della distribuzione globale di queste malattie ha dimostrato che esiste una congruenza geografica fra la presenza di queste emoglobinopatie e la diffusione della malaria, notoriamente endemica e non solo in Africa. Sulla base di questa osservazione si è concluso che le alterazioni dei geni delle globine si sono stabilizzate nelle popolazioni in quanto attivano un significativo meccanismo di difesa contro il parassita, che è stato studiato con attenzione.



Nel mondo le persone affette da talassemia sono intorno a 280 milioni, di cui circa 440.000 gravemente ammalati. La figura mostra la distribuzione della talassemia in Italia; l'evidente congruenza geografica con la prevalenza di malaria ha suggerito che le alterazioni dei geni delle globine possano aver contribuito a innescare un meccanismo di difesa dal parassita.



globuli rossi del sangue sono dei dischi biconcavi deformabili che possono facilmente transitare nei capillari sanguigni dove l'emoglobina cede ossigeno ai tessuti. Quando negli eritrociti è presente l'emoglobina mutata HbS (con la sostituzione dell'acido glutammico in posizione 6 della catena β con una valina), la dissociazione dell'ossigeno è seguita da rapida aggregazione di migliaia e migliaia di molecole di emoglobina HbS con formazione di lunghi polimeri e deformazione dell'eritrocita che assume la forma di una falce (Sickle in Inglese, da cui la denominazione della malattia). Gli eritrociti deformati e irrigiditi bloccano il flusso di sangue nei tessuti e provocano microinfarti causa di forte dolore, danno tissutale ed emolisi degli eritrociti con conseguente anemia. Si stima che globalmente i portatori sani siano oltre 40 milioni, e i malati ben oltre i 4 milioni.

La terapia di queste emoglobinopatie consiste principalmente in trasfusioni di sangue e trattamenti farmacologici necessari per contrastare gli effetti avversi dovuti all'emolisi dei globuli rossi con formazione di depositi di ferro nei tessuti. Purtroppo a 70 anni dalla scoperta della HbS e nonostante i massicci finanziamenti resi disponibili anche dal Presidente Nixon nel 1972, non è ancora disponibile una terapia farmacologica economica ed efficace; e questi pazienti devono essere continuamente trasfusi e ospedalizzati. Poiché le alterazioni sono legate a mutazioni recessive, un individuo eterozigote è portatore sano ma due eterozigoti possono generare (con probabilità del 25%) un figliolo/a omozigote che manifesta precocemente uno stato di malattia. Pertanto la prevenzione più efficace è stata ed è ancora il consultorio genetico; in Italia abbiamo avuto una ottima tradizione di strutture pubbliche specializzate, a cominciare dal consultorio istituito a Roma nel 1954 da Ezio Silvestroni e Ida Bianco.

Un'osservazione interessante ormai confermata, è l'effetto benefico sull'andamento della malattia che si osserva quando nei globuli rossi è presente una percentuale significativa di emoglobina fetale (HbF). Di cosa si

tratta? Come detto l'emoglobina dell'adulto (HbA) è un tetramero costituito da due catene α e due β ($\alpha_2\beta_2$). Durante la gestazione il feto sintetizza una diversa emoglobina detta ovviamente fetale, nella quale le catene β sono sostituite da catene γ (HbF, $\alpha_2\gamma_2$) caratterizzate da diversa sequenza amino acidica. Nella funzione di trasporto dell'ossigeno, HbF è molto simile alla HbA, a parte un lieve ma significativo aumento dell'affinità per l'ossigeno che consente al feto di sottrarre ossigeno dalla placenta. In Arabia Saudita individui omozigoti per la HbS non hanno crisi dolorose da vaso-occlusione perché nei loro eritrociti il contenuto di HbF (circa il 15%) è sufficiente a rallentare il processo di aggregazione per effetto di una "diluizione" relativa della HbS intracellulare, fenomeno studiato a fondo dal socio linceo William Eaton, NIH, Bethesda (Eaton WA, Hofrichter J, 1990, Adv Prot Chem, 40, 63).

Perché questa osservazione è importante?

La sintesi di emoglobina fetale HbF viene soppressa dopo la nascita quando inizia la sintesi dell'emoglobina adulta HbA. Il meccanismo di spegnimento del gene della catena γ dipende dal legame con il promotore di due proteine con funzione di repressore (Martym GE et al, 2018, Nature Genetics, 50, 498). Da quanto detto, dovrebbe essere ovvio che se fosse possibile (i) interferire con il legame dei repressori riattivando nell'adulto la sintesi di catena γ , e contemporaneamente (ii) reprimere la sintesi della proteina malata HbS, il problema dell'aggregazione intracellulare e conseguente deformazione dei globuli rossi sarebbe aggirato. Inoltre la possibilità di riattivare l'espressione del gene della globina γ con sintesi di sufficienti quantità di HbF risolverebbe la patologia responsabile della talassemia.

Il progetto di Crispr Therapeutics e Vertex Pharma che, come detto, sembra aver ottenuto risultati almeno promettenti, ha esattamente questo obiettivo. La sperimentazione clinica presentata al European Hematology Congress ha coinvolto complessivamente 5 volontari affetti da β talassemia grave ciascuno dei quali aveva ricevuto decine di trasfusioni all'anno; e 2 volontari affetti da anemia a cellule falciformi che avevano ricevuto ciascuno decine di trasfusioni all'anno e sofferto di numerosi (>5) episodi vaso-occlusivi dolorosissimi.

La complessa procedura di ingegneria cellulare messa a punto consiste in una serie di passaggi, a partire dall'isolamento da sangue periferico del paziente di cellule staminali ematopoietiche (cioè staminali immunocompatibili capaci di produrre tutte le cellule del sangue, compresi ovviamente i globuli rossi). Queste staminali vengono sottoposte a modifica del genoma utilizzando la tecnologia di genome editing basata sull'utilizzazione del sistema

CRISPR/Cas9, una procedura innovativa introdotta da Emmanuelle Charpentier e Jennifer Doudna (Jinek M et al, 2012, Science, 337, 816) che si è ormai universalmente imposta come una straordinaria rivoluzione nel campo dell'ingegneria genetica. Si rinvia per chi fosse interessato a una nota illustrativa pubblicata su HuffPost in occasione della conferenza che Emmanuelle Charpentier tenne all'Accademia Nazionale dei Lincei nel 2018.

Il protocollo clinico prevede che prima della somministrazione delle staminali modificate, il paziente venga sottoposto a una procedura di ablazione del midollo osseo tramite trattamento con busulfan, che distrugge le cellule ematopoietiche portatrici della mutazione patologica. La procedura prosegue con la somministrazione endovenosa di circa 2 miliardi di cellule staminali ematopoietiche dello stesso paziente, modificate come descritto. La scommessa è che le staminali "ingegnerizzate" finiranno per colonizzare il midollo osseo e, una volta insediate, produrre quantità progressivamente crescenti di globuli rossi contenenti emoglobina fetale HbF.

I dati comunicati dal Dott. Gorbacioglu il 12 giugno indicano che in tutti i 7 pazienti (i) le cellule staminali ematopoietiche hanno colonizzato il midollo osseo entro 30/40 giorni dall'infusione; (ii) le trasfusioni non sono più necessarie e si dimostrano livelli sostanziali di HbF (dal 50% al 90%); (iii) nel caso dei malati di anemia a cellule falciformi le crisi vaso-occlusive sono scomparse. Victoria Gray, una signora di colore gravemente malata di anemia a cellule falciformi, è stata la prima volontaria a ricevere il trattamento CRISPR/Cas9 come paziente del Dott. Haydar Francoul (Nashville, Tenn, USA); la Gray, che aveva 7 crisi vaso-occlusive all'anno e varie trasfusioni, è ora in buone condizioni senza trasfusioni, e conduce una vita quasi normale. Il Dr. Francis Collins, Direttore del National Institutes of Health di Bethesda, ha espresso grande soddisfazione per la guarigione di Victoria Gray: *"I think it's enormously exciting that we've reached a point where gene editing using Crispr is being applied to sickle cell disease. To be able to take this new technology and give those people a chance for a new life, which it really would be, is a dream come true."*

Nonostante l'entusiasmo suscitato da questo successo della medicina molecolare basato sull'applicazione della rivoluzionaria tecnologia Crispr/Cas9 per modificare in modo mirato il Dna delle staminali ematopoietiche del paziente, non possiamo non menzionare un paio di aspetti critici che dovranno essere considerati e affrontati. Il primo naturalmente è l'opportunità di essere cauti e prudenti, come dichiarato esplicitamente dai vertici di Crispr Therapeutics e Vertex Pharma, e dai responsabili scientifici di

questo ambizioso progetto. La sperimentazione umana su pazienti che soffrono di queste gravissime malattie del sangue dovrà essere allargata considerevolmente, e i trapiantati dovranno essere seguiti clinicamente per un più lungo periodo. Inoltre è chiaro che le tecnologie biomediche utilizzate per questa terapia sono complesse, costose, e richiedono strutture ospedaliere specializzate: l'estensione alle decine di milioni di individui affetti da queste gravi emoglobinopatie potrebbe essere un problema assai complesso, specie nei paesi più poveri del mondo. Questo è il motivo per cui alcuni Laboratori di eccellenza sono strenuamente impegnati a scoprire una piccola molecola, idealmente un farmaco già in commercio, che possa rallentare il processo di polimerizzazione intracellulare causa della deformazione a falce dei globuli rossi di portatori di HbS. Attendiamo nuovi risultati interessanti prima di cantar vittoria per questi nuovi successi della medicina molecolare.

Articolo pubblicato il 27 giugno 2020 su
<https://www.huffingtonpost.it/author/accademia-dei-lincei/>