

## TERAPIA GENICA IN CAMPO ORTOPEDICO

V. Vismara<sup>1</sup>, R. Giorgino<sup>1</sup>, L. Mangiavini<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Scuola di specializzazione in Ortopedia e Traumatologia, Università di Milano

<sup>2</sup>IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi

<sup>3</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute, Università di Milano

La terapia genica ha l'obiettivo di trattare patologie mediante l'inserimento di sequenze geniche, come per esempio polimeri di acidi nucleici, all'interno di cellule somatiche. Le cellule somatiche, una volta modificate geneticamente, iniziano ad esprimere stabilmente la sequenza del gene inserito (**Figura 1**).

La terapia genica necessita quindi l'utilizzo di vettori che veicolino il materiale genetico all'interno della cellula.

Esistono due grandi categorie di vettori: i vettori virali e quelli non virali. Nel caso di vettori virali il trasferimento di sequenze geniche viene denominato trasduzione, mentre nel caso dei vettori non virali, transfezione. Questi ultimi, tra cui possiamo ricordare il DNA naked e i liposomi, hanno però una efficacia inferiore rispetto ai vettori virali (1).

I vettori virali sono dei virus privati della loro capacità di replicazione e della loro patogenicità. Dal DNA virale vengono infatti rimosse tutte le sequenze codificanti per proteine essenziali nella replicazione e nell'infezione di altre cellule; le stesse vengono poi sostituite con le specifiche sequenze di DNA del gene di interesse. Una volta che il DNA viene trasferito nelle cellule ospiti, esso si integra in modo stabile e permanente con il DNA nativo, permettendo quindi l'espressione del gene trasdotto. Nel caso in cui, invece, la sequenza genica dovesse rimanere in forma episomiale, l'espressione della cassetta transgenica sarà esclusivamente transitoria.

Tra i virus principalmente impiegati per tali approcci, i più comuni sono: gli adenovirus, i retrovirus e i virus adeno-associati (AAV). I virus AAV ricombinanti (r-AAV) sono generalmente preferiti per le loro caratteristiche intrinseche di bassa immunogenicità e patogenicità. Infatti, gli r-AAV non necessitano della divisione cellulare come prerequisito per l'espressione transgenica. Questo è particolarmente importante per ottenere l'espressione di determinati geni in cellule che hanno uno scarso potenziale proliferativo, come i condrociti (2).

Una volta individuato il vettore più adatto, è importante individuare la tecnica da utilizzare per favorire l'ingresso del vettore nel tessuto target. Esistono anche in questo caso due diverse strategie: in vivo ed ex vivo (**Figura 2**). Nel primo caso un vettore viene iniettato direttamente nell'area di interesse oppure viene incorporato in una matrice biologicamente compatibile, che viene successivamente impiantata nel tessuto. In questo modo le cellule che vengono a contatto con il vettore acquisiscono le sequenze geniche di interesse. Queste nuove cellule geneticamente modificate sintetizzano e rilasciano i prodotti transgenici in grado di modificare il tessuto circostante. La tecnica ex vivo invece, prevede il prelievo e l'isolamento di cellule dal tessuto di interesse, l'espansione in vitro e infine la trasduzione con il vettore virale. In quest'ultima tecnica, il vettore può essere anche incorporato in una matrice cellularizzata, che viene successivamente coltivata in vitro. In quest'ultimo

caso, le cellule trasdotte efficacemente vengono successivamente selezionate, e seminate su uno scaffold biocompatibile da impiantare nel tessuto di interesse.

Sebbene le tecniche in vivo siano più semplici da sviluppare e meno costose, esse presentano dei limiti che riguardano la sicurezza della procedura, in quanto il virus inattivato, viene iniettato direttamente all'interno del corpo. I vettori più comunemente utilizzati in questo tipo di approccio sono gli adenovirus, HSV, AAV, lentivirus e i vettori non virali.

Le tecniche ex vivo sono invece più costose e invasive in quanto solitamente richiedono due steps: il primo per prelevare le cellule dal tessuto di interesse e il secondo per effettuare l'impianto delle nuove cellule trasdotte. Queste tecniche consentono di focalizzare l'espressione transgene nel tessuto. In questi approcci, i vettori più utilizzati sono i retrovirus.

In campo ortopedico, la terapia genica rappresenta un'opzione promettente per il trattamento delle lesioni della cartilagine articolare. La capacità rigenerativa dei condrociti è infatti molto limitata e dunque le strategie per implementare la condrogenesi sono di particolare interesse per la ricerca. In questo campo, la terapia genica si pone come obiettivo quello di indurre la proliferazione, la condrogenesi e la produzione di matrice cellulare cartilaginea.

I vettori virali sono i più utilizzati in questo campo in quanto permettono la trasduzione di sequenze geniche in vitro in condrociti articolari o in cellule multipotenti, in associazione con scaffold biocompatibili.

Le cellule sinoviali, i condrociti e le cellule multipotenti prelevate dal midollo osseo, tessuto adiposo o cordone ombelicale rappresentano i target migliori di queste terapie. Gli studi sperimentali si sono principalmente concentrati sulla trasduzione di sequenze geniche codificanti per fattori di crescita, come per esempio Insulin Growth Factor (IGF-1), Bone Morphogenic Protein-2 and -7 (BMP-2 or -7) e Cartilage-derived morphogenetic proteins 1 and 2 (CDMP-1 and -2), transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ), fibroblast growth factor family (FGF-2), growth/differentiation factor 5 (GDF-5), parathyroid hormone-related protein (PTHrP). L'obiettivo principale è in questo caso di stimolare la produzione di matrice cartilaginea.

Un'altra valida strategia prevede la trasduzione di sequenze codificanti fattori di trascrizione coinvolti nella condrogenesi: Sox9, Cart-1, ERG (ets related gene), Sodic Hedgehog, Wnt. In questo caso le cellule trasdotte esprimono tali fattori di trascrizione che inducono il differenziamento condrocitario di cellule multipotenti residenti nel tessuto.

Un'altra possibile applicazione della terapia genica in ambito cartilagineo prevede la modulazione di geni coinvolti nella degenerazione del tessuto, come per esempio geni codificanti per citochine pro-infiammatorie (Interleukin-1 o Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ). L'obiettivo è quello di interrompere il processo infiammatorio che determina la distruzione nel tessuto, come accade nell'osteoartrosi (3).

In questo caso si possono utilizzare sia tecniche in vivo che prevedono l'iniezione intraarticolare dei vettori; o tecniche ex-vivo che prevedono la selezione in vitro delle cellule trasdotte e il successivo impianto di uno scaffold cellularizzato nell'area danneggiata.

In uno studio recente è stato dimostrato che l'aumentata espressione di IGF-1 o Interleukin 1 Receptor Antagonist (IL1-Ra) in cellule sinoviali riduce il processo degenerativo articolare. Al contrario, l'aumentata espressione di TGF-B1 e BMP2 ha determinato un'anormale proliferazione di cellule sinoviali, causando fibrosi all'interno dell'articolazione. La stimolazione delle cellule sinoviali con fattori di crescita potrebbe quindi generare fenomeni di ipertrofia; le tecniche di terapia genica applicate a questo tipo cellulare dovrebbero di conseguenza focalizzarsi sull'espressione di fattori condroprotettivi (2).

I condrociti si adattano meglio a tecniche ex vivo, soprattutto alle culture 3D in vitro nelle quali i vettori virali si sono dimostrati molto più efficaci rispetto a quelli non virali e l'utilizzo di fattori prevalentemente anabolici come il TGF-B1, BMP-2, IGF-1, BMP-7 e SOX9 si è dimostrato particolarmente promettente (3).

Anche gli approcci in vivo hanno dato risultati positivi; infatti, l'espressione r-AAV mediata di FGF-2 nei conigli ha dimostrato un miglioramento nella riparazione delle lesioni osteocondrali.

L'elevato potenziale condrogenico delle cellule staminali mesenchimali (MSC) rende queste cellule un altro target ideale della terapia genica in campo cartilagineo. Studi, in vivo ed ex vivo hanno dato buoni risultati, indipendentemente dall'origine delle MSC (midollo osseo o tessuto adiposo). Il prelievo e l'espansione cellulare delle MSCs non prevede inoltre la violazione dell'ambiente articolare e rappresenta quindi una procedura meno invasiva. In studi recenti, BM-MSCs trasdotte con TGF1, o human SOX9, sono in grado di differenziarsi in condrociti e di produrre una matrice cartilaginea con le stesse caratteristiche di quella prodotta dai condrociti articolari.

In sintesi, i vettori virali sono particolarmente utili per modificare geneticamente condrociti o MSCs da combinare con scaffolds compatibili.

L'utilizzo di vettori di AAV ricombinanti trova particolare impiego nell'applicazione in vivo a livello articolare. Per esempio, l'iniezione di cellule trasdotte con Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) direttamente nell'articolazione sinoviale, ha dato miglioramenti significativi di riparazione cartilaginea in assenza di reazioni avverse, confermando anche il profilo a bassa immunogenicità di questi vettori.

La terapia genica è stata anche applicata per patologie ossee, come per esempio malattie metaboliche, prima tra tutte l'osteoporosi, oppure malattie genetiche, come l'osteogenesi imperfetta. In questi casi sono le strategie ex vivo che prevedono l'utilizzo di cellule staminali geneticamente modificate si sono rivelate le più efficaci (4,5).

Nel caso dell'osteoporosi, queste tecniche si pongono l'obiettivo di aumentare la mineralizzazione ossea, stimolando gli osteoblasti, o di diminuire il riassorbimento, inibendo gli osteoclasti. Nel primo caso, sono stati ottenuti ottimi risultati con l'impiego di Interleukin 1 Receptor antagonists (IL-1Ra) o PTH 1-34, direttamente iniettati a livello intramidollare; o con l'utilizzo di BMP2 trasdotta con vettori adenovirali. Nel secondo caso, studi animali hanno dimostrato che l'espressione di osteoprotegerina (OPG), inibendo l'attività osteoclastica, previene il riassorbimento osseo (6).

L'osteogenesi imperfetta, è una malattia genetica causata da diverse mutazioni a carico del gene COL1A1 che codifica per le catene pro $\alpha$ 1 e pro $\alpha$ 2 del collagene di tipo 1, o da mutazioni di geni che codificano per proteine coinvolte nelle modificazioni post-traslazionali del Collagene di tipo I. Il collagene di tipo I risulta quindi qualitativamente o quantitativamente alterato; di conseguenza, i pazienti sviluppano fratture fin dalla vita intra-uterina o più tardivamente in base al tipo di mutazione. La terapia genica potrebbe quindi curare definitivamente la malattia ristabilendo un Collagene di tipo I qualitativamente e quantitativamente corretto. Tuttavia ci sono ancora delle difficoltà tecniche da superare, in quanto la sequenza genica codificante per COL1A1 risulta essere troppo grande creando quindi dei problemi nella trasduzione cellulare.

La stimolazione della formazione di osso, a livello più circoscritto, offre buone prospettive per il trattamento di difetti ossei, di necrosi avascolari o per l'induzione di fusioni spinali. A tale scopo, si possono sfruttare sia le tecniche in vivo che ex vivo. Tra i fattori di crescita che hanno riscosso maggiore successo, si distinguono diverse BMPs (prima tra tutti BMP-2), le quali hanno sicuramente sia un potenziale osteogenico che osteo-induttivo. Tuttavia, l'eccessiva stimolazione ossea mediante queste molecole può indurre la formazione di osso ectopico, o la degenerazione tumorale. Per permettere quindi un rilascio controllato di questi fattori si possono utilizzare degli scaffold polimerici, che prendono il nome di gene-activated matrices (GAM), sui quali possono essere seminate le cellule trasdotte (7). I metodi di trasduzione del materiale genico sono simili a quelli impiegati per ottenere nuovo tessuto cartilagineo, ma in questo caso le cellule target sono principalmente cellule staminali derivanti dal midollo osseo (BM-MSCs).

Nel caso di fratture e difetti di consolidazione, la trasduzione di sequenze geniche che codificano per BMP-2 è stata adottata in diversi trials su animali di piccola dimensioni, con buoni risultati. Per esempio, per sostituire difetti ossei, sono state utilizzate GAM costituite da uno scaffold di collagene combinato con un vettore virale codificante per PTH-34 o in alcuni casi per BMP-4, oppure formate da un allograft osseo combinato a vettori adenovirali codificanti per geni associati al rimodellamento osseo (BMP2, ALK2 o RANKL combinato con VEGF). Mancano invece studi su animali di grossa taglia e sugli uomini, in quanto queste tecniche sono molto costose e richiedono tempi molto lunghi.

Inoltre, per quanto riguarda la riparazione di difetti ossei, la terapia genica non offre ad oggi vantaggi superiori rispetto alle tecniche gold standard che prevedono l'utilizzo di impianti di osso autologo o allogenico.

Per concludere, la terapia genica sia in campo cartilagineo che in campo osseo ha grosse potenzialità. Prima di applicare questa tecnica nella pratica clinica, sono però necessari ulteriori studi in vitro e in modelli animali per validare queste tecniche e per valutarne la sicurezza.

## References:

1. Madry, H., Padera, R., Seidel, J., Langer, R., Freed, L. E., Trippel, S. B., and Vunjak-Novakovic, G. (2002) Gene transfer of a human insulin-like growth factor I cDNA enhances tissue engineering of cartilage. *Hum Gene Ther* **13**, 1621-1630
2. Cucchiari, M., and Madry, H. (2005) Gene therapy for cartilage defects. *J Gene Med* **7**, 1495-1509
3. Madry, H., and Cucchiari, M. (2014) Tissue-engineering strategies to repair joint tissue in osteoarthritis: nonviral gene-transfer approaches. *Curr Rheumatol Rep* **16**, 450
4. Atasoy-Zeybek, A., and Kose, G. T. (2018) Gene Therapy Strategies in Bone Tissue Engineering and Current Clinical Applications. *Adv Exp Med Biol* **1119**, 85-101
5. Evans, C. H. (2012) Gene delivery to bone. *Adv Drug Deliv Rev* **64**, 1331-1340
6. Evans, C. (2011) Gene therapy for the regeneration of bone. *Injury* **42**, 599-604
7. D'Mello, S., Atluri, K., Geary, S. M., Hong, L., Elangovan, S., and Salem, A. K. (2017) Bone Regeneration Using Gene-Activated Matrices. *AAPS J* **19**, 43-53

Figura 1

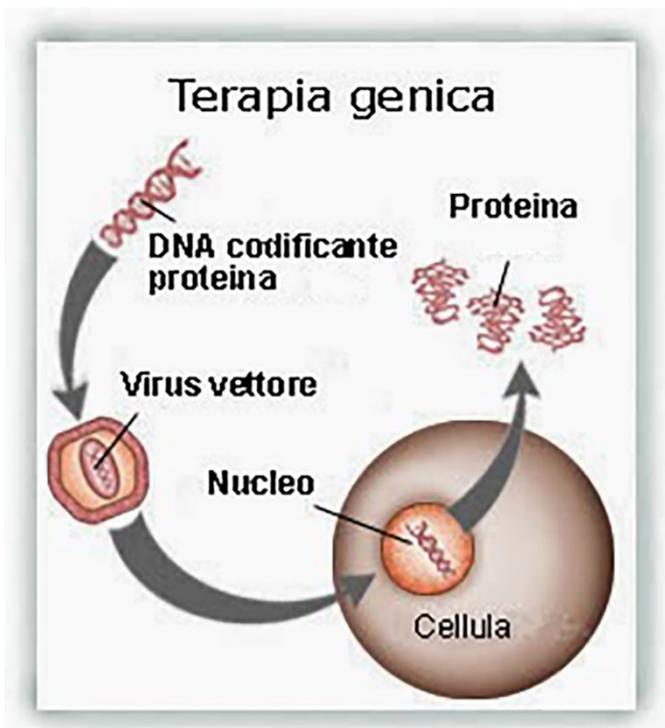
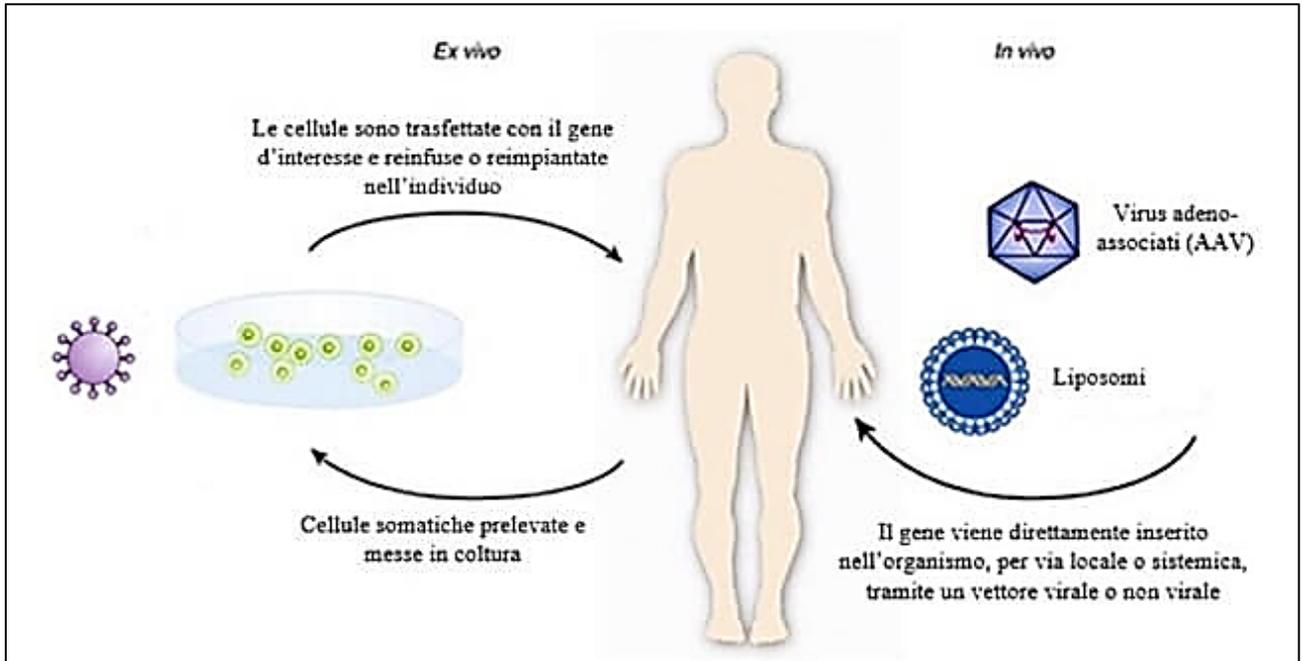


Figura 2



Tecniche di terapia genica