laboratorio con un vettore che porta il gene corretto, e re-infuse nel paziente in ospedale dopo aver eliminato il midollo osseo talassemico sempre in ambiente ospedaliero.
(Per ulteriori informazioni https://www.zynteglo.eu/)

COS'E' LA TERAPIA GENICA? QUALI SONO I PASSAGGI NELL'UTILIZZO DEL PRODOTTO APPROVATO RECENTEMENTE ZYNTEGLO®?

I passaggi 1 e 4 descritti qui sotto avvengono in ospedale, i passaggi 2 e 3 in un laboratorio specializzato.
Di seguito i 4 passaggi:

1) Gli specialisti clinici, (ematologi/trapiantologi) raccolgono le cellule dal midollo osseo, ma oggi, più comunemente, dal sangue periferico del paziente. In questo caso, il paziente riceve farmaci specifici per aiutarlo a produrre un numero più elevato di *cellule staminali emopoietiche progenitrici CD34+* che vengono richiamate dal midollo osseo al sangue periferico, cioè farmaci che *facilitano la migrazione delle cellule staminali dal loro sito naturale che è il midollo osseo verso il sangue periferico del paziente. Questo procedimento è noto come mobilizzazione delle cellule staminali.*
2) Le cellule bersaglio (CD34+) vengono quindi preparate e messe in cultura in laboratorio con speciali fattori di crescita per aiutarle a riprodursi, crescere ed espandersi. È in queste cellule che il gene della β-globina "corretto" e "funzionante" verrà inserito. Questo risultato si ottiene con l'aiuto di un "portatore" del gene prescelto detto *"vettore"*. Il vettore deve avere una struttura piccola e la capacità di penetrare nelle cellule bersaglio e trasferire il gene "corretto" della β-globina. Per far questo, utilizzando il protocollo Zynteglo®, il vettore utilizzato è un virus che appartiene alla famiglia dei *Lentivirus*. Questi virus, che in condizioni normali sono altamente infettivi e possono provocare gravi malattie nell'uomo, vengono modificati in laboratorio, prima del loro utilizzo, per *eliminare tutte le strutture infettanti*. I virus sono così sicuri per l'uso umano mentre mantengono sia la loro capacità di penetrazione nel nucleo delle cellule che di integrarsi nel DNA delle cellule bersaglio. In questo modo, il virus può trasferire l'informazione corretta del gene della globina alla progenie delle cellule bersaglio, *mantenendo il beneficio terapeutico per tutta la vita*.
3) Questo si ottiene quando il vettore, il virus, che contiene il gene della β-globina viene messo in coltura con le cellule staminali CD34+ raccolte in precedenza. Questo processo è noto come *trasduzione* e descrive il trasferimento dell'informazione genica "corretta" (il gene della β-globina nelle cellule staminali CD34).
4) *Le cellule CD34+ che adesso contengono il gene della β-globina "corretto" o normale vengono definite come "prodotto"*. Quando vengono completati tutti i controlli di sicurezza e qualità, questo prodotto viene re-infuso nel sangue ma solo dopo che il paziente ha ricevuto uno speciale trattamento, detto *condizionamento*. Questa procedura è un tipo di chemioterapia, che solitamente ricevono i pazienti oncologici, necessaria per sopprimere il midollo osseo del paziente e creare lo spazio per ricevere il "prodotto". Una volta che il "prodotto" viene re-infuso nel paziente troverà la strada per il midollo osseo – questo processo è conosciuto come *attecchimento*.

In questo modo il sistema ematopoietico, e più specificamente i GR, viene ricostituito con cellule geneticamente corrette. (Fig. 8)

Unitamente alle indicazioni terapeutiche approvate per Zynteglo®, i pazienti devono rispettare alcuni criteri di inclusione per poter intraprendere in sicurezza questo trattamento: *Generalmente, a parte alcune caratteristiche genetiche*
(i) Essere in buone condizioni cliniche;
(ii) Essere adeguatamente chelati e trasfusi;
(iii) Avere funzionalità cardiaca, renale ed epatica accettabile;
(iv) Essere maggiori di 12 anni e potere, per ragioni di sicurezza, ricevere i farmaci per:
   a. la mobilizzazione delle cellule staminali, e
   b. il condizionamento prima dell'infusione del prodotto genico.

Ogni paziente interessato a ricevere questo trattamento deve fare un colloquio specifico su base individuale con il suo medico curante e con i trapiantologi per verificare la sua eleggibilità ad intraprendere questa procedura.

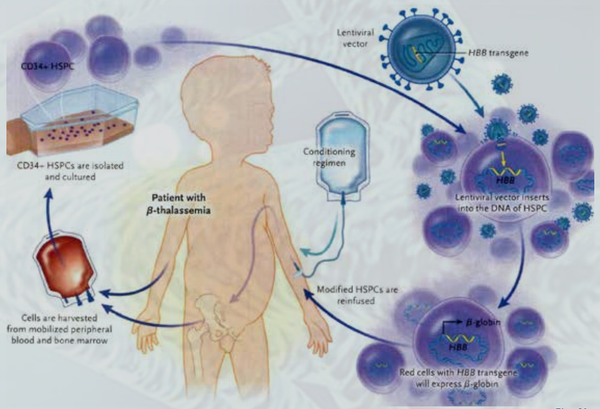


Fig. 8[3]

[3] Dal New England Journal of Medicine, 2019; 381:455-464, DOI:10.1056/NEJMra1706910
[4] Zynteglo® ha ricevuto l'approvazione condizionata. Questo significa che sono richieste più evidenze riguardo a questo farmaco che l'azienda deve fornire. Ogni anno, l'Agenzia Europea del Farmaco (EMA) valuterà qualunque nuova evidenza si rendesse disponibile e questa valutazione verrà aggiornata per quanto necessario. Maggiori dettagli sul processo di approvazione condizionata si possono avere su: ema.europa.eu/en/human-regulatory/marketing-authorisation/conditional-marketing-authorisation

Glossario:

Emopoiesi o Ematopoiesi - il processo per produrre le cellule del sangue

Cellule emopoietiche o ematopoietiche - cellule che si stanno differenziando (maturazione) per produrre cellule del sangue

Mobilizzazione - un processo durante il quale vengono usati alcuni farmaci per provocare la migrazione delle cellule staminali ematopietiche dal midollo osseo al sangue periferico.

Cellule positive CD34 (CD34+) - Sono le cellule progenitrici che formano le cellule del sangue mature. Vengono "mobilizzate' e raccolte tramite un processo detto leucaferesi, che consente la raccolta di molte cellule dal sangue periferico.

HSPCs - abbreviazione di cellule staminali ematopoietiche progenitrici, es: cellule originarie capaci di produrre diversi tipi di cellule del sangue.
Trasduzione – trasferimento di materiale genetico (DNA) tramite un vettore virale nelle cellule del paziente fatte crescere fuori dal corpo.

Condizionamento - il processo per la preparazione del midollo osseo del paziente a ricevere le cellule staminali geneticamente modificate. Si realizza tramite la distruzione del tessuto ematopoietico del paziente con la chemioterapia (in questo caso) per fare posto alle nuove cellule staminali corrette.

Attecchimento - ricerca del posto appropriato nel midollo osseo che porta alla ricrescita delle staminali ematopoietiche ed alle cellule progenitrici.

THALIA

Questo opuscolo educazionale per il paziente dal titolo "La Terapia Genica nella β-talassemia e nelle Emoglobinopatie" è stato finanziato con fondi del Programma per la Salute dell'UE (2014-2020).

Co-funded by
the Health Programme
of the European Union

© Thalassaemia International Federation 2020
All rights reserved.

Thalassaemia International Federation
31 Ifigenias Street, 3rd Floor, 2007 Strovolos, Nicosia Cyprus
P.O. Box 28807, 2083 Strovolos, Nicosia Cyprus
Tel: +357 22 319 129 • Fax: +357 22 314 552
E-mail: thalassaemia@cytanet.com.cy
Website: http://thalassaemia.org.cy

La Thalassaemia International Federation (TIF) può aiutarti a rispondere a molte delle tue domande tramite il suo Comitato Scientifico Internazionale ed il programma educazionale.

- Visita il nostro sito (http://thalassaemia.org.cy)
- Richiedi ulteriore materiale educazionale sulla Terapia Genica (La Terapia Genica nella β-talassemia) che ti sarà inviato gratuitamente.
- Aggiornamenti relativi a tutti gli studi clinici sulla Talassemia ed altre Emoglobinopatie.
- Contatta la TIF al +357 22 319 129 [in servizio dalle 8:00 alle 15:00 dal lunedì al venerdì]

LA TERAPIA GENICA
nella talassemia

Traduzione:
Loris Brunetta

Revisione:
Prof.ssa M.D. Cappellini

THALASSAEMIA INTERNATIONAL FEDERATION

La Talassemia è una malattia genetica ereditaria

"Ereditaria" significa che questa patologia si trasmette dai genitori ai figli e il termine "genetica" descrive il MODO con cui si trasmette attraverso i GENI. Patologie diverse si trasmettono (o si ereditano) in modi diversi.

La talassemia si eredita secondo una modalità conosciuta in biologia e genetica come *'Mendeliana'* (dal nome dello scienziato che l'ha descritta), *autosomica*, perché colpisce ugualmente sia maschi che femmine e, *recessiva*, perché il figlio deve ereditare i due geni "difettosi" della globina, uno dal padre ed uno dalla madre, per poter sviluppare la forma grave di questa patologia, in questo caso la β-talassemia major.

CHE COSA SONO I GENI?

Sono i mattoni biologici del nostro corpo. Sono costituiti da una sostanza chimica conosciuta come Acido DesossiribоNucleico, abbreviato in DNA, che è una struttura filiforme con molti fili collegati tra loro in 23 coppie, detti CROMOSOMI. (Fig. 1). 22 di queste coppie sono gli stessi sia nei maschi che nelle femmine e sono chiamate autosomiche. La 23a coppia è diversa tra maschi e femmine proprio perché questa determina il genere, cioè se uno è maschio oppure femmina.

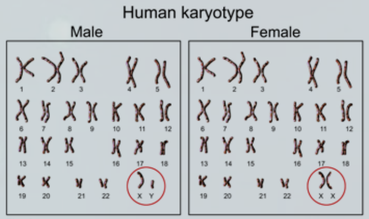


Fig. 1

COSA FANNO I GENI?

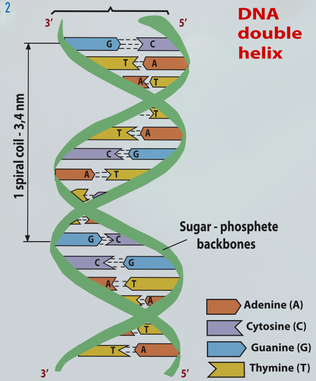
Un gran numero di GENI è necessario per svolgere le molte e complicate funzioni dell'organismo. Questi, infatti, forniscono tutte le informazioni biologiche necessarie ad un organismo vivente per controllare la vita, la crescita e lo sviluppo. Sono, in altre parole, i modelli unici di ogni individuo e costituiscono le unità biologiche dell'ereditarietà.

IL DNA CONTENUTO NEI GENI — UNO SGUARDO DA VICINO

Il DNA (Fig. 2) che compone i geni, assomiglia ad una scala con due strutture parallele, detta anche doppia elica, che supporta una serie di pioli, ciascuno composta da due strutture chimiche dette basi. Le quattro basi sono: *A (Adenina) T (Timina) C (Citosina) G (Guanina).*

Queste sono accoppiate in modo molto specifico: *A (Adenina) può accoppiarsi solo con T (Timina) e C (Citosina) può accoppiarsi solo con G (Guanina). (Fig. 3)*

Fig. 2



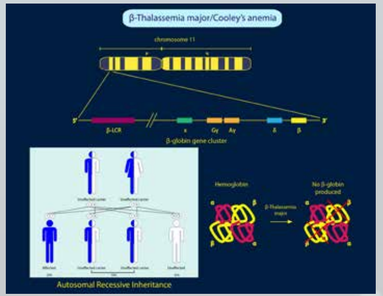
L'ordine (sequenza) con cui queste basi sono sistemate lungo questa "scala" costituisce, di fatto, il codice genetico dell'individuo. Queste sequenze prese tutte assieme formano quello che è comunemente conosciuto come "genoma" umano che contiene migliaia di geni.

DNA — GENI — CROMOSOMI PER L'EMOGLOBINA

Geni differenti controllano la produzione delle diverse proteine essenziali per la crescita normale ed il funzionamento dell'organismo. I GENI contenuti nei cromosomi *16* ed *11* (tra le 23 paia di cromosomi di un individuo), ad esempio, sono deputati alla produzione di una parte essenziale (detta globina) di una proteina conosciuta come *emoglobina*. Questa è un costituente importante del sangue e, più specificamente, dei Globuli Rossi (GR). (Fig. 3) La funzione principale dell'emoglobina è quella di trasportare a tutte le cellule, i tessuti e gli organi del corpo umano l'*ossigeno*, il *nutriente* fondamentale per lo svolgimento delle proprie funzioni.

Trecento (300) milioni di molecole di emoglobina sono contenute in CIASCUN Globulo Rosso.

Fig. 3



STRUTTURA DELL'EMOGLOBINA

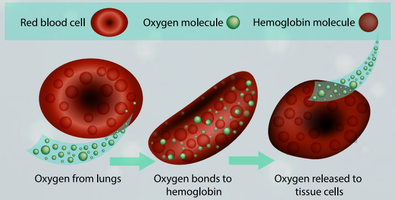
Una molecola di emoglobina è divisa in due parti:

La prima è la globina e consiste di quattro (4) strutture proteiche, note come *catene*, disposte in coppie corrispondenti. La globina adulta normale è costituita da *quantità uguali* di catene α (alfa) e β (beta) abbinate come $\alpha_2\beta_2$ e la loro produzione è regolata dai geni sul cromosoma 16, che controlla la produzione delle catene α-, e sul cromosoma 11, che controlla la produzione delle catene β. (Fig. 3)

La seconda struttura dell'emoglobina (Fig.4) è l'*eme - ferro*. Questa struttura ad anello, situata al centro di ciascuna delle quattro fasce di catene, contiene una molecola di *ferro* (Fig. 5). Il FERRO è l'elemento responsabile del colore rosso dei GR e, per estensione, del colore rosso del sangue.

Tuttavia, cosa molto importante, il ferro ha la capacità di *legare* e *rilasciare* facilmente l'*ossigeno*, rendendolo il veicolo perfetto perché i GR svolgano la loro funzione di trasporto dell'ossigeno per tutto il corpo. 3g su 4g (75%) di ferro sono usati per sintetizzare l'emoglobina.

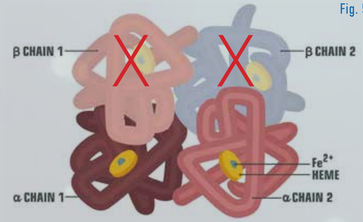
Fig. 4



DOVE VENGONO PRODOTTI I GR E LE ALTRE CELLULE DEL SANGUE?

Il *midollo osseo* è il sito della produzione delle cellule ematiche, incluse le cellule progenitrici dei GR. Il midollo osseo è un tessuto che si forma nella cavità centrale delle ossa es: nel cranio, colonna vertebrale, costole e bacino, negli adulti ed anche in altre ossa nei bambini.

Fig. 5



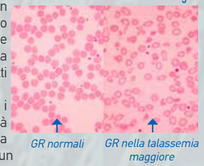
[1] g = grammo

Cosa accade nella β-Talassemia major?

Nella β-talassemia c'è un difetto, o mutazione (in biologia/genetica), nel DNA dei geni (Fig.5) del cromosoma 11, che controlla la produzione delle catene β della molecola globinica. Altri geni sul cromosoma 16, come detto, controllano la produzione di catene α. Come risultato della mutazione sul cromosoma 11, i geni beta non sono in grado di svolgere la loro funzione normale. Di conseguenza, poche o nessuna catena β vengono prodotte pertanto la produzione di emoglobina "funzionale", che richiede una quantità uguale di catene α e β, viene gravemente compromessa. Questo sbilanciamento delle catene è la causa principale della patofisiologia e di tutte le gravi cause cliniche della β-talassemia major.

QUANDO ACCADE?

Fig. 6



Questo accade quando un bambino eredita da ciascuno dei suoi genitori un gene mutato, non funzionante della β-globina e i principali effetti clinici comprendono:

(i) Grave anemia (poiché i GR hanno una quantità inadeguata di emoglobina adulta – possono avere un po' di emoglobina fetale - Hb-F) (Fig. 6);
(ii) Deformità ossee e cranio-facciali;
(iii) Ritardo di crescita e limitazione dell'attività fisica;
(iv) Complicanze multi-organo, es: epatosplenomegalia.

In mancanza di intervento medico, sopraggiunge la morte prematura entro la seconda decade di vita. *(Fig.7)*

COME VIENE CURATA LA B-TALASSEMIA MAJOR?

Nel corso degli anni, particolarmente dopo gli anni '60, l'eccellente lavoro delle comunità mediche e scientifiche si è focalizzato sull'identificazione di quegli elementi che rendessero possibile la sopravvivenza dei pazienti, per questo a cominciare dagli anni '90, ha preso il via lo sviluppo di farmaci e modelli di gestione. Questo ha consentito ai pazienti non solo di sopravvivere ma, cosa più importante, di vivere bene, di avere una qualità di vita decente, di acquisire una piena integrazione sociale (almeno in quei paesi che hanno dato priorità a questa patologia attraverso i piani sanitari nazionali). Le cure essenziali includono: **(i) Regolari (perlomeno mensili), trasfusioni di sangue con GR freschi appropriatamente conservati e perfettamente compatibili per tutto il corso della vita, (ii) terapia ferrochelante per la rimozione del ferro depositato negli organi vitali del corpo dovuto principalmente alla rottura dei GR trasfusi quando questi completano il loro ciclo vitale.**

In aggiunta alla terapia ferrochelante, *l'approccio multidisciplinare* è essenziale per ottenere buone percentuali di sopravvivenza ed una buona qualità di vita (secondo quanto riportato nelle Linee Guida Internazionali della TIF's[2]).

[2] Linee Guida per la gestione della talassemia trasfusione-dipendente. Terza edizione, 2014

Riassunto di cosa succede nella Thalassaemia Major non curata

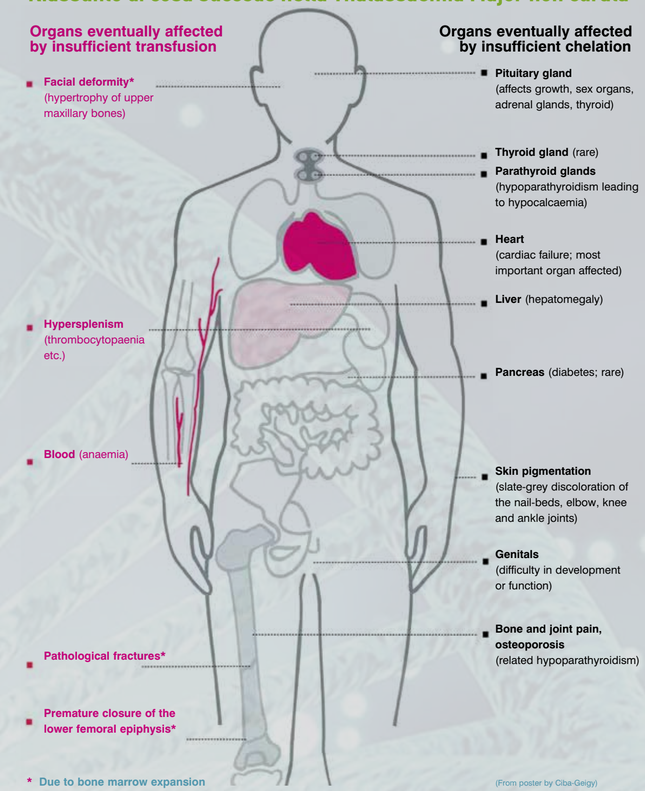


Fig. 7

METODI DI TERAPIA GENICA PER LA GUARIGIONE DELLA TALASSEMIA

Per molti decenni, l'attività di ricerca si è concentrata sull'identificazione di sistemi per GUARIRE questa patologia. Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT), conosciuto più comunemente come Trapianto di Midollo, ha contribuito significativamente alla realizzazione di questo obiettivo. Il Trapianto di Midollo, significa l'infusione di cellule staminali sane raccolte da un donatore compatibile dopo l'eliminazione delle cellule del midollo difettose del paziente, ha ottenuto risultati da buoni ad eccellenti nel corso degli anni. Questo è particolarmente vero per i più giovani e con un fratello HLA-compatibile, un prerequisito che è possibile purtroppo solo in una percentuale ristretta di pazienti non oltre il 20-30%. La ricerca lavora in questo senso per ulteriori miglioramenti, è attualmente in corso l'utilizzo di donatori compatibili non consanguinei (volontari) e donatori familiari non perfettamente compatibili. Tuttavia, non è ancora stato raggiunto un livello di successi paragonabile a quello ottenuto con i fratelli compatibili con l'eccezione di pochissimi centri di eccellenza nel Trapianto di Midollo.

Per decenni, anche la ricerca nell'università e nell'industria si è concentrata sul trovare soluzioni su base genica per la guarigione della talassemia. Lo scopo era, ed è tuttora, quello di rimpiazzare o correggere il GENE della globina difettoso del paziente. Mentre un certo numero di approcci diversi è ancora in corso, uno di questi ha raggiunto il successo ed ha recentemente ottenuto l'approvazione condizionale al commercio dall' Agenzia Europea del Farmaco (EMA) del suo "prodotto", che si chiama *Zynteglo®*. È un trattamento "personalizzato" nel quale le più *primitive cellule staminali ematopoietiche, CD34+*, che danno origine a tutte le linee cellulari del sangue (comprese quelle eritroidi), vengono raccolte dal paziente in ambiente ospedaliero, processate in