SOCIETÀ E ISTITUZIONI

TERAPIA GENICA

Comitato nazionale per la Bioetica

15 febbraio 1991

PRESIDENZA DEL CONSIGLIO DEI MINISTRI
DIPARTIMENTO PER L'INFORMAZIONE E L'EDITORIA

SOMMARIO

Presentazione 5

CONCLUSIONI GENERALI E PARERI DEL COMITATO NAZIONALE PER LA BIOETICA 7

Terapia genica 7

Definizione 7

Terapia genica germinale 7

Terapia genica somatica 8

Procedimento 8

Potenzialità e limiti 8

Possibili benefici e confronto con altre terapie alternative 9

Possibili rischi 9

Implicazioni etiche e giuridiche 9

Misure di controllo e condizioni di accettabilità della terapia genica somatica 10

Precedenti tentativi di terapia genica somatica nell'uomo 11

Conclusioni 11

TERAPIA GENICA: RELAZIONE TECNICO SCIENTIFICA 13

Stato attuale delle conoscenze 13

Prospettive e meccanismi di correzione genica 13

Tecniche di trasferimento genico 14

Possibilità e limiti della terapia genica 15

Tentativi di terapia genica 17

Implicazioni etiche e criteri guida 18

Rischio biologico 18

Liceità della terapia genica germinale 19

Liceità della terapia genica somatica 20

Principi giuridici nella terapia genica somatica 23

Condizioni di accettabilità e misure di controllo nella terapia genica somatica 25

CARATTERISTICHE DELLA TERAPIA GENICA NELLA MALATTIA DI IMMUNODEFICIENZA DA DEFICIT DI ADENOSIN-DEAMINASI (ADA) 27

Scopo della relazione 27

Razionale della terapia genica nella immunodeficienza da deficit di adenosin-deaminasi (ADA) 27

Cenni sul deficit di ADA 27

Terapia genica della linea germinale e di quella somatica 28

Schema generale della procedura e basi sperimentali di essa 29

Benefici della terapia genica: risultati attesi e confronto con terapie alternative 30

Precedente tentativo di terapia genica di deficit di ADA nell'uomo 33

Analisi dei possibili rischi della terapia genica in oggetto 34

Esame del caso programmato per la terapia genica di ADA e competenze tecniche professionali del gruppo di operatori 35

Considerazioni conclusive 36

Bibliografia generale 38

Articoli originali 40

Glossario 44

Riferimenti bibliografici 46

Membri del Comitato Nazionale per la Bioetica 48

ISTITUTO POLIGRAFICO E ZECCA DELLO STATO - P.V.

PRESENTAZIONE

Il Comitato Nazionale per la Bioetica approva in data odierna, 15 febbraio 1991, i seguenti documenti:

1) Terapia genica. Relazione tecnico-scientifica.
2) Caratteristiche della Terapia genica nella malattia di immunodeficienza da deficit di adenosin-deaminasi (ADA).
3) Conclusioni generali e proposte del Comitato.

Premessa generale

I componenti del Comitato hanno, all'inizio dell'attività del Comitato stesso, unanimemente riconosciuto che il tema della terapia genica — per la sua intrinseca novità e delicatezza — dovesse formare oggetto di uno dei primi contributi che il Comitato, a norma del Decreto istitutivo del 28 marzo 1990, è tenuto a fornire al Paese.

Durante i lavori del Comitato, si è verificato il primo esperimento di terapia genica.

L'autorizzazione a praticare il primo tentativo di terapia genica è stata data negli Stati Uniti alle 8.25 di venerdì 14 settembre 1990 dalla FDA per effettuare un trapianto di cellule con gene per ADA in una bimba con sistema immune compromesso, che è stato realizzato 4 ore dopo.

I linfociti sono stati infettati in vitro *con un retrovirus* difettivo per la replicazione *e contenente nel suo genoma il gene normale per l'ADA. Quattro ore dopo l'autorizzazione della FDA il test è stato effettuato.*

La paziente, una bambina di 4 anni è stata reinoculata con le cellule linfocitarie proprie contenenti un gene ADA estraneo dal gruppo di Michael Blaise, Kenneth W. Culver e W. French Anderson del National Heart, Lung and Blood Institute dell'N.I.H. Risultati importanti circa l'esito di questa terapia si potranno conoscere tra un anno.

Analoga approvazione è stata data dalla FDA ed un esperimento di terapia genica ideato dal chirurgo Steven Rosenberg del N.C.I. e consistente nell'introduzione del gene per il Tumor Necrosis Factor, TNF, in una particolare categoria di linfociti, prelevati da un paziente affetto da un tumore cutaneo altamente maligno (melanoma) e reinseriti nello stesso paziente affetto.

In Italia è stato programmato, ma non ancora effettuato, un tentativo di terapia genica somatica da parte di un gruppo noto a questo Comitato; si tratta di un qualificato gruppo di ricercatori, di livello internazionale, che adottano un protocollo analogo a quello in vigore negli U.S.A.

Anche a seguito di questi avvenimenti, il 1° Gruppo di lavoro (Scienze dell'ereditarietà) del Comitato Nazionale per la Bioetica, ha ritenuto di portare alacremente a compimento la discussione su questo tema, che rientra nella propria sfera di competenza, come definita a seguito della riunione collegiale del Comitato tenutasi il 13 luglio 1990.

Pertanto, è stato in grado di presentare in data 25 gennaio al Comitato, per l'approvazione definitiva, due relazioni fra loro strettamente coordinate:

1) Terapia genica. Relazione tecnico-scientifica, *affidata al Prof. De Carli integrata dai contributi e dalle osservazioni dei proff. Fiori, Nordio, Romano, Sgreccia, Stammati, Terragni.*

2) Caratteristiche della terapia genica nelle malattie da immunodeficienza da deficit di adenosin-deaminasi (ADA), *affidata al prof. Salvatore.*

Le due relazioni, lette e commentate, sono state approvate all'unanimità dal Comitato nella Seduta plenaria del 26 gennaio, recependo i suggerimenti dei Proff. Cattorini, D'Agostino, Dalla Torre, Flamigni, Isidori, Lecaldano, Levi Montalcini, Paoletti, Rescigno, Sgreccia, Stammati.

In tale data il 1° Gruppo di lavoro ha deciso di elaborare un documento di:

3) «Conclusioni generali e pareri del Comitato sulla terapia genica» *che ha lo scopo, sulla base delle nozioni scientifiche, analiticamente esposte nei documenti già menzionati, di formulare considerazioni riassuntive e linee operative in un linguaggio più facilmente comprensibile all'opinione pubblica.*

Quest'ultimo documento è stato sottoposto e approvato nella riunione del 15 febbraio dal Gruppo di lavoro ed è stato trasmesso, in pari data, all'esame del Comitato plenario.

Il Comitato, al termine della seduta, dà mandato al Presidente di trasmettere i vari documenti elaborati alla Presidenza del Consiglio.

Il Comitato formula altresì i più vivi ringraziamenti ai proff. Falaschi, Polli, Serra e Sgaramella, che hanno discusso le relazioni nella Seduta del Gruppo di lavoro del 25 gennaio.

Il Presidente
A. Bompiani

Roma, 25 febbraio 1991

CONCLUSIONI GENERALI E PARERI DEL COMITATO NAZIONALE PER LA BIOETICA

1. – **Terapia genica**

Definizione

Per terapia genica si intende l'introduzione in organismi o cellule umane di un gene, cioè di un frammento di DNA, che ha l'effetto di prevenire e/o curare una condizione patologica. Esistono in teoria due possibili tipi di terapia genica, il primo mira a correggere difetti genetici in cellule della linea germinale con effetto sulla discendenza e il secondo si propone di eliminare o ridurre difetti molecolari a livello delle cellule somatiche con effetti limitati all'individuo.

2. – **Terapia genica germinale**

La terapia genica rivolta a cellule germinali umane è allo stato attuale improponibile dal punto di vista etico e scientifico.

Il principio etico fondamentale chiamato in causa è quello della intangibilità del patrimonio genetico di un soggetto, che può tuttavia conciliarsi con quello del diritto di un individuo al mantenimento o al recupero dell'efficienza della propria dotazione genica.

Dal punto di vista scientifico-empirico l'improponibilità dell'intervento deriva dal fatto che non esistono attualmente le basi concettuali e tecniche per prevedere gli effetti di una terapia genica germinale sullo sviluppo dell'individuo e della sua discendenza; non si deve tuttavia considerare preclusa in futuro la possibilità che, con l'acquisizione di nuove conoscenze e lo sviluppo di tecniche più efficienti, si realizzi una integrazione mirata di geni nella linea germinale senza alterare la struttura e la funzione del genoma.

Dal punto di vista giuridico, l'ipotesi di modificazioni genetiche non terapeutiche delle cellule della linea germinale si mostra in contrasto insupe-

rabile con il diritto di ciascuno alla preservazione della propria identità genetica, strettamente ancorata alla garanzia costituzionale che tutela direttamente la dignità di ogni singola persona.

Invece la praticabilità di eventuali interventi che abbiano il carattere e le finalità di una terapia genica germinale non incontra ostacoli di ordine giuridico e costituzionale.

3. – **Terapia genica somatica**

3.1. – *Procedimento*

Il metodo generalmente utilizzato per effettuare la terapia genica consiste nelle seguenti tappe:

a) prelievo e coltura *in vitro* di cellule proliferanti dal paziente affetto;

b) introduzione nelle cellule coltivate *in vitro*, mediante opportune procedure, del gene normale;

c) reintroduzione delle cellule modificate geneticamente nel paziente affetto.

3.2. – *Potenzialità e limiti*

Gli interventi da considerare ai fini della proponibilità, sia dal punto di vista etico che scientifico, dovrebbero riguardare patologie che rispondano ai seguenti requisiti:

– malattie dovute al difetto di un singolo gene strutturale recessivo (e quindi suscettibile di cura completa con introduzione anche di una sola copia del gene sano) ed espresso in cellule dotate di attività proliferativa;

– malattie gravi per cui l'aspettativa di sopravvivenza delle persone affette è scarsa in condizioni di vita normale;

– malattie per le quali non sono attualmente disponibili valide terapie alternative che comportino meno rischi di quelli prevedibili con la terapia genica.

Tra le malattie umane finora considerate come possibili candidati per terapie di cellule somatiche sono da annoverare:

– la deficienza di adenosin-deaminasi (ADA);
– il deficit di purino-nucleoside fosforilasi (PNP);
– la sindrome di Lesch-Nyhan;
– la fibrosi cistica;
– la distrofia muscolare di Duchenne;
– l'emofilia.

Per tutte queste malattie esiste infatti la disponibilità del gene normale, isolato e clonato, in alcuni casi del tutto recentemente. Si sta sperimentando la possibilità di terapia genica somatica anche in alcuni tumori, soprattutto di quelli che interessano i tessuti emopoietici.

3.3. – *Possibili benefici e confronto con terapie alternative*

Dal punto di vista teorico, la terapia genica somatica dovrebbe permettere la guarigione completa e permanente dei pazienti affetti a seguito di un singolo trattamento con cellule autologhe modificate geneticamente *in vitro*.

I sistemi cellulari utilizzabili nella sperimentazione umana presentano ancora limitazioni e pertanto è necessario, in questo momento, effettuare trattamenti ripetuti.

È comunque indispensabile in ogni proposta di Terapia Genica Somatica condurre una attenta analisi comparativa con i metodi terapeutici tradizionali attualmente disponibili.

3.4. – *Possibili rischi*

Il primo rischio, inerente alla tecnica stessa della terapia genica somatica, riguarda possibili mutazioni dannose dovute alla inserzione casuale del costrutto genico nella cellula. Il secondo riguarda l'attivazione di geni che possono causare disordini proliferativi e l'eventualità di fenomeni di rigetto dovuti all'acquisizione di nuove specificità antigeniche da parte delle cellule modificate.

La definizione di questi rischi, che non debbono essere sopravvalutati, comporta la necessità di effettuare prove sperimentali su cellule umane *in vitro* e su modelli animali *in vivo*. Più remota, anche se non escludibile in linea teorica, la possibilità di una diffusione orizzontale del vettore virale usato per il trasferimento del DNA nella cellula. È per questo motivo che è necessario usare un vettore virale difettivo, cioè incapace di riprodursi da solo e di infettare altre cellule.

4. – **Implicazioni etiche e giuridiche**

La Terapia Genica Somatica pone problemi etici a livello individuale e sociale, sia comuni a ogni nuovo intervento medico, sia specifici in rapporto alla particolare natura del trattamento.

La praticabilità della terapia genica somatica è da ammettersi in quanto essa, non discostandosi per aspetti essenziali da altre forme di intervento

terapeutico, può essere ricondotta al medesimo ordine di principi (diritto alla salute) che legittimano il complesso di tali attività sanitarie.

La terapia genica somatica indispensabile a sottrarre il paziente alla morte, appare poi specificamente fondata sul diritto costituzionale alla vita che è, in pari tempo, diritto alle cure necessarie a scongiurare l'evento mortale e al godimento di tutti i diritti fondamentali costituzionalmente garantiti. Pertanto tale tipo di terapia deve sottostare soltanto ai criteri generali di ogni prestazione medica, fondata su presupposti scientifici accettati, su indicazioni precise e sull'assenza di controindicazioni; potrà essere effettuata in assenza di terapie alternative sicuramente più efficaci, tenuto conto della storia naturale e del momento d'insorgenza della malattia. La terapia dovrà porsi in atto soltanto con il consenso informato del paziente; il diritto a chiedere l'intervento potrà essere attivato da chi esercita anche di fatto la tutela su minori o incapaci che non possano chiederlo direttamente.

Il medico, considerato il carattere tuttora sperimentale della terapia genica somatica, non potrà essere obbligato alla prestazione che gli viene richiesta fintantoché essa non diventi strumento terapeutico consolidato e non alternativo: peraltro, per non vanificare il diritto inalienabile del malato alla vita e alla salute, il Comitato ritiene indispensabile sollecitare il legislatore a istituire senza ritardo centri specializzati per la effettuazione di tale terapia.

5. – **Misure di controllo e condizioni di accettabilità della terapia genica somatica**

Considerato il quadro sopra esposto, pare opportuno sollecitare forme di controllo sia sul materiale, sia sui metodi e le procedure seguite negli interventi di terapia genica somatica. Le misure che si potrebbero adottare sono di tre tipi:

a) notifica dei protocolli usati nel trasferimento genico *in vivo* per quanto riguarda sia le tecniche molecolari sia quelle cellulari da parte delle apposite strutture eventualmente previste dall'ordinamento;

b) valutazione dell'idoneità delle strutture di laboratorio e della qualificazione scientifico-tecnica degli operatori da parte di organi competenti.

Oltre al rispetto di tutte le norme per la sperimentazione umana, alla luce delle normative nazionali e internazionali, tra cui il consenso informato del paziente, per l'accettabilità dell'intervento andrebbero accertate le seguenti condizioni:

1) il ricorso alla terapia genica è motivato dalla gravità della malattia e dalla mancanza di una terapia alternativa efficace e con effetti durevoli;

2) l'esito positivo dell'intervento è plausibile e prevedibile in base a un modello scientificamente valido, verificato anche mediante la sperimentazione sull'animale in prove a lungo termine;

3) è trascurabile l'incidenza di effetti collaterali che in ogni caso devono essere commisurati ai benefici attesi.

Su questi punti concorda la maggior parte delle leggi e delle norme di numerosi paesi e di organismi sovranazionali come il Consiglio d'Europa e il Parlamento Europeo.

6. – **Precedenti tentativi di terapia genica somatica nell'uomo**

L'autorizzazione ad effettuare il primo tentativo di terapia genica è stata data negli Stati Uniti nel settembre 1990 dalla FDA e il gruppo di Blaese, K. W. Culver e W. F. Anderson del National Heart, Lung and Blood Institute dell'N.I.H. ha immediatamente proceduto al trapianto di cellule con gene per ADA in un paziente con sistema immune compromesso.

Risultati importanti circa l'esito di questa terapia si potranno conoscere tra un anno.

Analoga approvazione è stata data dalla FDA ad un esperimento di terapia genica ideato dal chirurgo Steven Rosenberg del N.C.I. e consistente nell'introduzione del gene per il Tumor Necrosis Factor, TNF, in una particolare categoria di linfociti, prelevati da un paziente affetto da un tumore cutaneo altamente maligno (melanoma) e reinseriti nello stesso paziente affetto.

In Italia è stato programmato, ma non ancora effettuato, un tentativo di terapia genica somatica da parte di un gruppo di ricercatori dell'Ospedale S. Raffaele di Milano. Per quanto noto a questo Comitato, si tratta di un qualificato gruppo di ricercatori, di livello internazionale, che adottano un protocollo analogo a quello in vigore negli USA.

7. – **Conclusioni**

1 – Il Comitato Nazionale per la Bioetica riconosce innanzitutto la fondamentale differenza fra terapia genica della linea germinale, capace cioè di influenzare la trasmissione del patrimonio genetico alle generazioni successive, e terapia genica della linea somatica, che interessa le cellule somatiche di un singolo individuo.

Questi ha il diritto di fruire per la salvaguardia della propria salute e della propria vita di tutti i progressi delle scienze biologiche e mediche.

2 - In accordo con quanto riconosciuto e stabilito da tutti gli organismi internazionali ed europei, la terapia genica della linea germinale è, allo stato attuale, non proponibile e non ammissibile nell'uomo per un complesso di ragioni tecniche, scientifiche, sociali e quindi anche di natura giuridica ed etica.

3 – Di converso, la terapia genica di cellule della linea somatica, in presenza di adatte condizioni e dopo aver ottemperato a rigidi requisiti di natura non solo tecnico-scientifica, ma anche di ordine giuridico ed etico, è completamente accettabile da tutti i punti di vista, essendo assimilabile ad una terapia sostitutiva o ad un trapianto non a livello di organo, di tessuto o di cellule ma a livello molecolare.

4 - Ogni tentativo di terapia genica della linea somatica dovrebbe essere accompagnato e preceduto da una accurata analisi dei seguenti fattori:

a) possibili benefici e possibili rischi di tale terapia;

b) confronto in termini di benefici, rischi ed efficacia della terapia in oggetto con terapie tradizionali riconosciute ed accettate dalle scienze mediche;

c) soddisfacimento delle misure di controllo e delle condizioni di accettabilità della terapia genica somatica stabilite dalle norme vigenti e dalle consuetudini accettate dalla comunità scientifica nazionale e internazionale.

5 - Il Comitato Nazionale per la Bioetica ritiene che la terapia genica somatica possa rientrare nel dominio più generale della sperimentazione nell'uomo di nuovi indirizzi terapeutici e debba come tale rispondere a tutti i criteri di accettabilità comuni a questi tipi di interventi.

6 – Il Comitato Nazionale per la Bioetica richiama l'attenzione sull'opportunità che una definita autorità:

a) aggiorni l'elenco di condizioni patologiche ereditarie, congenite o acquisite, per le quali sussista l'indicazione di terapia genica somatica;

b) definisca criteri guida per le operazioni tecnico-preparative caratteristiche del settore e per i metodi di monitoraggio successivo degli esiti delle esigenze terapeutiche, anche in stretto collegamento con i Centri e i ricercatori operanti in altri paesi;

c) proceda alla raccolta di dati sulla sperimentazione in corso.

TERAPIA GENICA: RELAZIONE TECNICO-SCIENTIFICA

1. – **Stato attuale delle conoscenze**

1.1. – *Prospettive e meccanismi di correzione genica*

La terapia genica, nell'accezione originale del termine, è una forma di trattamento causale di una malattia ereditaria determinata da una alterazione nel genoma, delimitabile entro uno specifico «locus» corrispondente ad un gene. Oggetto della terapia è quindi un evento mutazionale «puntiforme» a livello molecolare, e come tale distinguibile da modificazioni più estese, microscopicamente evidenti, che possono coinvolgere interi cromosomi o regioni cromosomiche. La mutazione può consistere nell'assenza dell'intera sequenza nucleotidica del gene, di una parte di essa o in una modificazione della sequenza stessa, anche limitata ad un singolo nucleotide. Suscettibili di correzione si considerano primariamente mutazioni recessive che devono essere presenti in doppia dose, e quindi su ambedue i cromosomi omologhi di una coppia, per manifestarsi nella condizione patologica. Questa costituzione è propria di un individuo omozigote, mentre la presenza della mutazione su uno solo dei cromosomi omologhi configura lo stato di eterozigote portatore.

È sufficiente l'aggiunta di una sola copia della forma normale del gene per annullare in un omozigote recessivo l'effetto della mutazione e quindi ripristinare il livello normale della funzione. La correzione di una mutazione dominante, in grado di esprimersi in singola dose, non è ottenibile mediante la semplice aggiunta del gene normale, ma richiede meccanismi più complessi e più specifici oppure l'intervento di più geni che interagiscono tra loro. Processi di questo tipo, basati su una ricombinazione omologa o sull'azione di geni soppressori o modificatori in grado di neutralizzare la mutazione, sono ben noti nei microorganismi ed in cellule di organismi superiori, comprese quelle umane coltivate *in vitro*, ma non sono stati identificati, o sono mal definiti, nella patologia genetica *in vivo*. È ovviamente da escludere la possibilità di correggere anomalie cromosomiche sia di numero

(mutazioni genomiche) che di struttura (aberrazioni cromosomiche). L'intervento correttivo su una mutazione genica consiste idealmente nella sostituzione del gene alterato o di una parte di esso con una sequenza nucleotidica corrispondente alla variante normale del gene stesso. Per la correzione della mutazione dominante è necessario anche che la sequenza alterata venga perduta. Si tratta in ogni caso di eventi rari recuperabili, in taluni sistemi sperimentali, con l'uso di appropriate tecniche selettive (Belmont et al., 1988). Più frequentemente l'inserimento del gene normale avviene in un sito qualsiasi del genoma e porta ad una duplicazione del locus genetico interessato.

L'estensione dell'approccio terapeutico, basato sul trasferimento di geni a patologie tumorali non ereditarie, a disfunzioni determinate da infezioni virali o a malattie poligeniche, ha portato ad una definizione più ampia del termine terapia genica, con il quale viene indicata la cura o prevenzione di una malattia ereditaria, congenita o acquisita mediante l'introduzione di un gene o di un frammento di DNA distribuito a tutte le cellule dell'organismo (terapia genica germinale) o confinato alle cellule di uno o più tessuti (terapia genica somatica).

1.2. – *Tecniche di trasferimento genico*

Il trasferimento del gene isolato e clonato può essere effettuato con diverse tecniche che fanno uso di agenti meccanici, fisici e chimici o biologici. Il DNA può essere introdotto per microiniezione direttamente nel nucleo cellulare o nelle cellule per elettroporazione (trasporto facilitato da stimolazione elettrica), mediante precipitazione con fosfato di calcio, fusione con liposomi o involucri di globuli rossi, con microproiettili di tungsteno o mediante un vettore virale (Anderson, 1984). La scelta della tecnica di trasferimento del materiale genetico è determinata dal tipo di cellula ricevente e questo a sua volta è in rapporto all'obiettivo della terapia, che può coinvolgere la linea germinale o limitarsi alle cellule somatiche. La microiniezione, per il numero limitato di interventi che possono essere eseguiti sulle singole cellule, si adatta al trasferimento genico in cellule uovo fecondate o nelle cellule embrionali prodotte dalle prime divisioni dello zigote. Le altre tecniche, basate su trattamenti con agenti chimici o infezione con vettori virali, comportano l'esposizione massiva delle cellule e l'isolamento dei prodotti della trasformazione genetica. Per questa via può essere solo effettuata la terapia genica somatica. Il trasferimento genico mediante fusioni e passaggi agevolati attraverso la membrana cellulare o precipitazione con fosfato di calcio, a causa delle basse efficienze di trasformazione ottenibili, richiede l'impiego di sistemi selettivi e l'uso di fattori di crescita *in vitro* per l'isola-

mento e la propagazione delle cellule corrette geneticamente. Il vettore virale si presenta come il mezzo di elezione, poiché pressoché la totalità delle cellule trattate può assumere il DNA esogeno (Armentano et al., 1987; Chasse et al., 1989; Hantropoulos et al.,1989). I risultati più incoraggianti sono stati finora ottenuti con virus animali ad RNA, comunemente noti come retrovirus, capaci di integrare la loro informazione nel DNA della cellula infettata, per retrotrascrizione o trascrizione inversa. La loro derivazione da ceppi virali che inducono tumori nel topo (leucemie e sarcomi) non rappresenta un pericolo per l'uso in terapia in quanto la specificità dell'effetto tumorigeno è molto stretta. Onde evitare una propagazione incontrollata del virus nelle cellule dell'organismo ricevente, viene usato un vettore ad «autocontenimento», ovvero privato della capacità di replicarsi.

La produzione di particelle virali mature necessarie per l'infezione della cellula bersaglio viene ottenuta con l'aiuto di un altro virus difettivo, libero o integrato nel DNA di una linea cellulare, in grado di sopperire alle funzioni mancanti (virus o linea cellulare helper) (Yu et al., 1986).

La terapia genica mediante trasformazione o trasfezione con DNA esogeno passa necessariamente attraverso una fase di mantenimento *in vitro* o di coltura con attiva crescita cellulare. La coltura di cellule somatiche, come si è visto, può protrarsi per un numero elevato di generazioni cellulari. Per la correzione genetica dello zigote è conveniente, anche se non obbligata, la fecondazione *in vitro*. Quando si interviene durante le prime divisioni cellulari dell'embrione, la fecondazione può avvenire *in vivo* ed il prodotto di concepimento può essere raccolto e sottoposto a interventi correttivi *in vitro*. Il mantenimento nelle condizioni artificiali di coltura è in ogni caso di breve durata: dopo qualche giorno, quando l'embrione ha raggiunto lo stadio di 8-16 cellule, viene effettuato il trasferimento *in vivo*.

1.3. – *Possibilità e limiti della terapia genica*

Ai fini di una valutazione delle effettive possibilità di applicazione in campo clinico può essere considerata solo la terapia genica somatica per inserzione o aggiunta poiché tutte le altre forme di intervento correttivo o sostitutivo ed ogni tipo di terapia germinale, gametica o zigotica, o non sono al momento praticabili o non hanno sufficiente supporto sperimentale e convalidazione.

La possibilità di terapia genica somatica è limitata allo stato attuale a caratteri a determinismo genetico semplice con i seguenti requisiti: *a*) recessività della forma difettiva, *b*) costitutività della manifestazione fenotipica, ossia indipendenza da fenomeni di controllo legati ad un coordinamento

spaziale e funzionale dell'informazione sul genoma, *c*) espressione del carattere in tessuti dotati di attività proliferativa sia *in vivo*, anche se sporadica, sia *in vitro*, *d*) sufficiente recupero della funzione corretta in presenza di una bassa proporzione di cellule geneticamente competenti. Patologie ereditarie che soddisfano a queste condizioni sono estremamente rare. Le malattie per le quali oggi si pone concretamente la prospettiva di una terapia genica sono la sindrome di Lesch Nyhan, causata da una deficienza per l'enzima ipoxantinaguaninafosforibosiltransferasi (HGPRT) e caratterizzata da gravi sintomi neurologici, e due immunodeficienze dovute a carenze per specifici enzimi, la purinonucleosidefosforilasi (PNP) e l'adenosinadeaminasi (ADA). Sviluppi a più lungo termine si possono prevedere per la terapia genica di malattie determinate da mutazioni per geni soggetti a precisi controlli durante lo sviluppo e il differenziamento come le emoglobinopatie, (Thomas, 1986) o espressi in tessuti non sempre o facilmente accessibili ai vettori virali o ai veicoli cellulari, come fibrosi cistica, distrofia muscolare di Duchenne ed emofilia A (Thomas, 1986). Risultati positivi sono stati già ottenuti nell'animale e in cellule umane coltivate *in vitro* (Apperley et al., 1990; Bender et al., 1989; Bordignon et al., 1989; Kantoff et al., 1987; Kyle et al., 1990; Morgan et al., 1987; Mosier et al., 1988; Ohi et al., 1990; Sayer et al., 1990; Selden et al., 1987; Smith et al., 1990) e si stanno sperimentando procedure che consentono un trattamento più mirato per quanto riguarda il tessuto bersaglio ed un più alto grado di espressione del gene trasferito (Li et al., 1990; Nolta and Kohn, 1990; Novak et al., 1990). La specificità di tessuto, possibile attraverso il riconoscimento da parte del virus vettore di recettori cellulari, e la ricombinazione omologa, sono i principali obiettivi delle ricerche in corso (Lemarchandel and Montagutelli, 1990; Jasin and Berg, 1988; Nabel et al., 1989; Smithies et al., 1985). La soluzione di questi problemi consentirà di estendere ad un più ampio spettro di malattie genetiche, ad alcuni tipi di tumori e a malattie virali l'applicazione della terapia genica e potrà rendere più sicuro il trattamento (Faraji-Shaldan, 1990; Gaitskhok, 1990. Koenig et al., 1987; Kordyum et al., 1990; Lander et al., 1990. Monaco et al., 1986; Moser et al., 1990,; Russel, 1990; Shvartsman et al., 1990; St-Louis and Verma, 1988; Weinthal et al., 1990).

Per quanto riguarda il tessuto bersaglio, quello che più si presta alla terapia genica somatica, e più estesamente usato nei sistemi sperimentali, è il midollo osseo, che contiene elementi staminali capaci di proliferazione *in vitro* ed *in vivo* (Ilock et al., 1989). Anche il sangue del cordone ombelicale può costituire una utile fonte di cellule ematopoietiche trapiantabili (Broxmeyer et al., 1989). La correzione dei difetti genetici è stata inoltre ottenuta trasfettando con DNA esogeno cellule endoteliali (Wilson et al., 1990), che-

ratinociti, cellule epatiche, fibroblasti (Hoeben et al., 1990) e linfociti (Kantoff et al., 1986). È stata infine dimostrata nei sistemi animali la possibilità di un trasferimento diretto di geni mediante trasfezione con DNA virale e plasmidico (Dubensky et al., 1984; Kohn and Kantoffi, 1989; Wolf et al., 1990).

1.4. – *Tentativi di terapia genica*

Il primo tentativo di terapia genica nell'uomo è stato effettuato nel 1970 da S. Rogers che trattò con virus del papilloma di Shope pazienti con deficit dell'enzima arginasi associato a gravi sintomi neurologici. L'intervento, giustificato dalla osservazione che cellule difettive per questo enzima riacquistavano la funzione a seguito dell'infezione con il virus, non ebbe successo. Un secondo tentativo fu realizzato da Cline nel 1980 in pazienti talassemici. Cellule midollari di questi pazienti furono trasfettate con DNA ricombinante contenente la sequenza corretta del gene della beta-globina.

Il risultato, negativo, fu accompagnato dalla generale disapprovazione per l'incauta esecuzione dell'esperimento.

Nel 1989 Rosenberg e collaboratori hanno trapiantato in malati terminali di cancro linfociti TIL (Tumor Infiltrating Lymphocytes) trasfettati con il gene per la resistenza alla neomicina. Lo scopo dell'intervento era quello di studiare, mediante l'uso del marcatore selettivo, la distribuzione spazio-temporale delle cellule trapiantate nel tessuto tumorale, in vista della possibilità di una terapia mirata del tumore stesso. Questa è stata programmata successivamente dallo stesso gruppo di ricercatori in pazienti affetti da melanoma nei quali verrebbero infusi linfociti TIL autologhi trasformati con il gene per il fattore di necrosi tumorale (TNF). La sperimentazione clinica finora effettuata ha dimostrato che la terapia con TIL modificati geneticamente è ben tollerata e non ha effetti collaterali indesiderati. È stato inoltre osservato che i linfociti trapiantati mantengono ed esprimono il gene esogeno trasdotto, si localizzano preferenzialmente nelle masse tumorali metastatiche e permangono in circolo per periodi fino a due mesi (Rosenberg et al., 1990).

Nel 1990 Blaise et Anderson hanno effettuato il primo trattamento di un paziente affetto da deficienza ADA mediante trasferimento genico con vettore retrovirale in linfociti prelevati e ritrapiantati nello stesso paziente. Dati informativi sull'esito della sperimentazione in corso potranno essere ottenuti tra pochi mesi. L'approvazione per l'uso in terapia di un nuovo prodotto iniettabile il PEG-ADA, costituito dall'enzima adenosinadeaminasi purificato ricoperto con glicolpolietilenico in grado di prolungare la vita media della molecola nel sangue da pochi minuti a qualche giorno, ha messo in

discussione il ricorso alla geneterapia. La somministrazione di PEG-ADA effettuata settimanalmente porta indubbiamente ad un miglioramento del quadro clinico. Il confronto dei due tipi di terapia nell'animale ha dimostrato un netto vantaggio per la correzione della deficienza con l'enzima intracellulare prodotto sotto il controllo del gene trapiantato rispetto a quella ottenuta con l'enzima extracellulare. Tuttavia seguendo la raccomandazione della FDA americana Blaise e collaboratori hanno accettato per i nuovi tentativi da effettuare su pazienti di combinare il trattamento PEG-ADA con la reinfusione di linfociti corretti geneticamente.
Sono attualmente allo studio tentativi di terapia genica in pazienti affetti da mucoviscidosi da sottoporre a trattamento con aerosol di sospensioni di adenovirus difettivi portatori del gene per il CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator). Questa sperimentazione è giustificata dall'esito positivo di prove eseguite nell'animale, che dimostrano come le cellule dell'epitelio polmonare possano assumere il virus con il gene normalmente funzionante (Crystal et al., 1990).

2. – **Implicazioni etiche e criteri guida**

2.1. – *Rischio biologico*

Oltre ai problemi di ordine etico a livello individuale e sociale comuni ad ogni tipo di intervento medico innovativo, la terapia genica pone interrogativi specifici in rapporto alla particolare natura del trattamento proposto. Un aspetto di particolare rilevanza è costituito dalla valutazione del rischio: al proposito devono essere considerati due tipi di danno, quello fisiologico e quello genetico. Per quanto riguarda la *terapia genica germinale* un intervento nella cellula uovo fecondata sia di tipo meccanico (microiniezione) che di tipo fisico (elettroporazione) comporta una elevata incidenza di letalità ed un rischio di anomalie morfogenetiche, possibile, ma non determinabile. La percentuale di successi nei sistemi sperimentali, misurata come frazione di embrioni capaci di sviluppo normale è generalmente bassa, non superando il valore dell'1 %. Nel potenziale danno fisiologico rientra anche la manifestazione ectopica del carattere dovuta alla mancanza di segnali guida sul frammento di DNA trasferito o all'inserimento del gene in una sede non appropriata del genoma. Dal punto di vista genetico-strutturale l'integrazione anomala del gene può provocare mutazioni deleterie in altri geni che possono essere inattivati o attivati dando luogo a deficit funzionali o a processi

neoplastici. Tali mutazioni presenti anche nelle cellule germinali vengono trasmesse alla discendenza (Gridley et al., 1987).

Nella terapia genica somatica il problema della letalità cellulare indotta dal trattamento non sussiste in quanto solo le cellule vitali selezionate *in vitro* vengono ritrapiantate nell'organismo ricevente. Rimane il rischio dell'espressione ectopica del carattere, dovuta a migrazione cellulare o a diffusione incontrollata del vettore virale, o della mutagenesi da inserzione. Quest'ultimo effetto deve essere considerato solo per quanto riguarda l'attivazione di geni che possono causare in generale disordini proliferativi, ed in particolare sviluppo di neoplasie. Non sono poi da escludere reazioni di rigetto dovute all'acquisizione *in vitro*, di nuove specificità antigeniche da parte delle cellule portatrici del genoma manipolato. È anche da tenere in conto, nei casi di autotrapianto di cellule midollari, il danno a breve e a lungo termine provocato dall'irraggiamento che in alcuni casi è previsto per l'eliminazione delle cellule staminali.

Nella definizione del danno potenziale del trasferimento genico basato sull'uso di vettori retrovirali è da considerarsi anche l'eventualità di contaminazione di altri individui che vengono a contatto con pazienti sottoposti al trattamento. La possibilità di infezione dovrebbe essere esclusa dalle caratteristiche stesse del vettore usato, definito da Gilboa come «virus senza geni virali».

2.2. – *Liceità della terapia genica germinale*

Un principio etico fondamentale che può essere chiamato in causa nella terapia genica è quello della intangibilità del patrimonio ereditario di un soggetto, che, sul piano scientifico, trova supporto nel principio della conservazione dell'identità genetica.

Esiste in teoria la possibilità, con tecniche dell'ingegneria genetica e citologica già collaudate in sistemi sperimentali, di correggere *in vitro* un gene difettivo isolato da una singola cellula dell'embrione precoce e di reintrodurlo in una cellula dello stesso embrione, nella sua posizione regolare sul cromosoma, attuando in questo modo una vera terapia da autotrapianto genico. È anche ipotizzabile un trapianto omologo effettuato utilizzando il gene normale di uno dei genitori o dei componenti della fratria. Con queste uniche eccezioni, tutti gli altri tipi di intervento correttivo eseguiti sulla linea germinale con materiale genetico estraneo, della stessa specie o di specie diversa portano ad una modificazione della struttura e organizzazione propria del genoma del soggetto con conseguenze non prevedibili nello sviluppo dello stesso individuo e nella sua discendenza.

Un altro interrogativo etico che la terapia genica germinale pone riguarda la responsabilità di decidere quali geni trasmettere alla discendenza, ammesso che l'identità genetica venga mantenuta e che il gene possa inserirsi correttamente nei cromosomi e seguire le normali leggi mendeliane dell'eredità. Il problema non tocca solo la singola persona con la sua progenie, ma si estende alla collettività, in quanto un intervento sistematico sul genoma di singoli individui può avere riflessi sulla struttura genetica della popolazione. Una azione negativa sul carico genetico, ossia l'insieme delle mutazioni deleterie che passano da una generazione all'altra potrebbe essere giustificato, mentre non sarebbe accettabile un intervento mirato al potenziamento di determinate qualità o all'induzione di nuovi caratteri. Modificazioni indotte nel genoma con questa finalità rientrano nell'eugenetica positiva che non è ammissibile a priori per due ragioni fondamentali: non esistono criteri validi per stabilire quali caratteri fisici o comportamentali debbano essere migliorati o innovati a beneficio dell'individuo e della società; quand'anche risultasse proponibile un intervento a scopo perfettivo non vi sarebbe il modo di decidere quali potrebbero essere i destinatari. In assenza di una attenta sorveglianza la terapia genica germinale potrebbe portare ad abusi e condotte aberranti che si risolverebbero nella negazione della libertà individuale e nella discriminazione tra soggetti.

Se a queste riserve e preoccupazioni sullo sviluppo della terapia germinale si aggiunge il rischio biologico derivante, allo stato attuale, dalla imprevedibilità degli effetti sulla discendenza, si comprende come generale sia il consenso sulla inaccettabilità di questa forma di terapia genica. Accanto a questa posizione di intransigenza si deve tuttavia registrare un atteggiamento più possibilista secondo il quale il giudizio dovrebbe essere sospeso in attesa dei risultati delle prove cliniche in terapia genica somatica in corso e di un allargamento del dibattito pubblico. Da un punto di vista scientifico non deve considerarsi preclusa la possibilità che con l'acquisizione di nuove conoscenze sui meccanismi di trasformazione genetica, di mutagenesi di ricombinazione e di riparazione del DNA ed il potenziamento delle tecniche di ingegneria genetica, specie per quanto riguarda la messa a punto di vettori «intelligenti», si realizzino terapie geniche più mirate e più sicure anche a livello germinale.

2.3. – *Liceità della terapia genica somatica*

A conclusioni diverse si deve giungere per la terapia genica somatica che sotto il profilo etico, viene generalmente considerata sullo stesso piano di un trapianto di organo o di tessuto.

La possibilità che, esclusa la liceità di una manipolazione genetica con effetti generazionali, il medico proponga ed effettui dei tentativi terapeutici, scientificamente fondati, introducendo nell'organismo malato delle cellule somatiche modificate in parti del genoma, per tentare un apporto di geni in sostituzione dei geni assenti o alterati, rientra in una metodologia che, nella sua intima natura, non si discosta essenzialmente da una serie di procedure diagnostiche e terapeutiche in uso, che alterano profondamente il soma del paziente. Si consideri infatti, da un lato, qualsiasi trattamento terapeutico che comporti l'asportazione di organi importanti, perché ammalati, ovvero la sostituzione di parti di essi con materiale protesico inserito a permanenza o, ancor più, il trapianto eterologo che inserisce nel ricevente organi interi, o midollo osseo o, nella trasfusione sanguigna, quantità rilevanti di sangue, compatibile per alcuni aspetti immunologici, ma sostanzialmente estraneo. In tutti questi casi sono immesse nell'organismo del ricevente le più svariate molecole e strutture organiche con cellule dotate del loro proprio genoma, profondamente diverse da quello del paziente. A ben guardare, inoltre, molta parte della terapia medica produce nel paziente alterazioni collaterali che vengono accettate nel bilancio calcolato rischi/benefici.

E ciò è particolarmente vero nella terapia delle neoplasie maligne dove i farmaci, benché mirati essenzialmente a colpire cellule alterate, hanno effetti dannosi anche su cellule sane.

In tutta la medicina, dunque, vi sono azioni diagnostiche e terapeutiche che presentano aspetti di rischio ed anche di danno, previsto ed attuato con il fine primario di realizzare la guarigione del paziente, od una maggiore sopravvivenza, ovvero una attenuazione di svariati disturbi altrimenti ineliminabili.

Tutte queste elementari considerazioni riconducono il problema della terapia genica con cellule somatiche modificate ad essere nient'altro che un metodo come tanti altri, che presenta — specie nella sua prima fase di applicazione — comuni problemi di precisa indicazione, di valutazione della fondatezza scientifica del progetto e dei rischi che esso comporta. Il che non obbliga il medico, che abbia ottenuto il consenso degli aventi diritto adeguatamente informati, a garantire il risultato.

Va tuttavia notato che la paragonabilità della terapia genica con il trapianto, per quanto riguarda le conseguenze rilevanti da un punto di vista etico, può essere messa in discussione in quanto è diversa la qualità del rischio ed il tipo di interazione tra la struttura biologica trapiantata (organo o gene) con il resto dell'organismo.

Mentre nel caso del trapianto di organo o di tessuto il danno consiste nel mancato ripristino della funzione, nel trapianto genico, oltre a questo

esito negativo si deve considerare la possibilità che altre cellule dello stesso tessuto bersaglio o di altri tessuti vengano stabilmente alterate nella loro attività. Ciò rende più complessa la valutazione dell'accettabilità dell'intervento, più rigide le condizioni richieste per le modalità di esecuzione e più impegnativa l'informazione del paziente, che deve essere ampia ed articolata per un razionale consenso. La scelta in ogni caso deve dipendere da una attenta analisi del rapporto rischio-beneficio.

Per quanto riguarda il problema delle eventuali terapie alternative — la cui esistenza è stata invocata come argomento tale da dissuadere dalla terapia genica — anche questo va considerato con i criteri generali della metodologia scientifica medico-biologica. Ogni tentativo di nuova terapia ha i suoi margini di rischio di insuccesso, ma i progressi della medicina si sono realizzati proprio nel tentativo di sostituire un determinato procedimento terapeutico, quando esista, con un altro più efficace.

È ovvio che sarebbe assurdo scegliere una soluzione altamente opinabile ed incerta quando esistano soluzioni terapeutiche collaudate e di certa efficacia: ma ciò non risulta sussistere nel caso delle malattie genetiche per le quali, allo stato attuale, si propongono tentativi meditati di terapia genica, con un'unica eccezione, che verrà discussa più avanti. Questo è un altro motivo che giustifica tali tentativi, finalizzati esclusivamente a fornire al paziente maggiori possibilità di una vita migliore se non, per ora, di una autentica guarigione. Anche in questo caso, ovviamente, è essenziale che gli aventi diritto diano il loro consenso dopo essere stati chiaramente informati dell'intimo significato dell'esperienza terapeutica che si intende compiere e del valore delle terapie alternative.

Dal punto di vista etico è forse utile distinguere la questione della *liceità* e quella della *obbligatorietà*.

Questa distinzione è richiesta dal fatto che la terapia genica è tuttora in fase sperimentale e per tutto il tempo in cui rimarrà tale, perciò, va considerata come sperimentazione terapeutica (vedi Dichiarazione di Helsinky).

Nella sperimentazione terapeutica si persegue un doppio risultato:.

a) il risultato principale di giovare al paziente su cui si applica il trattamento;

b) il risultato connesso e consequenziale che consiste nel convalidare la sperimentazione allo scopo di curare altri pazienti.

In questa situazione:

a) il paziente può lecitamente chiedere di accedere a tale trattamento, ma non è moralmente obbligato a farlo neppure in forza del dovere

morale di ognuno di provvedere alla propria vita e alla propria e altrui salute;

b) il medico può proporlo ed è obbligato a proporlo là dove esistano dei centri che sono idonei a praticare tale terapia, ma non è obbligato a praticarla personalmente se non è convinto della efficacia o pensa di non poter garantire la migliore esecuzione e, in definitiva, perché è una terapia sperimentale.

Da un punto di vista etico-sociale vanno tenute presenti possibili deviazioni individuabili nelle discriminazioni tra soggetti, che si creerebbero nella selezione dei pazienti e nella tendenza ad estendere questa forma di terapia, indicata solo per malattie genetiche altrimenti incurabili, a semplici scostamenti dalla normalità. Specie nella fase di avvio della sperimentazione clinica si avverte la necessità di una informazione pubblica corretta, che valga a dimensionare il significato e gli obiettivi della terapia genica.

Oggetto di discussione può essere il limite della terapia genica effettuata in periodo prenatale. La precocità dell'intervento potrebbe spingersi verso lo stadio embrionale, dove il completamento dell'organogenesi dovrebbe porsi come limite inferiore. Diversamente la terapia genica somatica inevitabilmente assumerebbe le caratteristiche di una terapia genica germinale.

2.4. – *Principi giuridici nella terapia genica somatica*

Per una valutazione giuridica degli interventi di terapia genica somatica, occorre immediato il ricorso ai parametri rappresentati dai diritti alla vita e alla salute, garantiti implicitamente il primo (v. in tal senso, per es., la sent. n. 27/75 della Corte Costituzionale), esplicitamente l'altro dagli artt. 2 e 32 della Costituzione. Pur senza approfondire la questione, non è difficile comprendere che l'ambito della protezione da essi garantita è manifestamente disuguale d'ampiezza e che, talora, anche là dove le loro sfere protette si sovrappongono (per es. riguardo alla pretesa della salubrità dell'ambiente e dei luoghi di lavoro), al risultato protettivo reclamabile sulla base di entrambi si può pervenire attivando semplicemente le potenzialità garantistiche del diritto alla salute, cioè del meno ampio fra i due. Nella parte, invece, in cui essi tutelano l'integrità fisica, cioè il nucleo originario sul quale i diritti della personalità e i diritti all'esistenza delle condizioni per il loro pieno sviluppo poggiano la loro base, essi, per lo più, agiscono congiuntamente. Per i trattamenti di terapia genica somatica, in particolare, la richiesta di un paziente (o di altri aventi potestà di avanzarla per lui), a esservi sottoposto, non si esprime soltanto nella pretesa generica, azionabile

quanto meno verso le strutture sanitarie pubbliche, a un trattamento terapeutico che ne ripristini l'integrità fisica indebolita (che si fonderebbe sul diritto alla salute), ma, più incisivamente, nella pretesa, verso le medesime strutture, a quel particolare trattamento terapeutico che, a differenza di ogni altro, sia idoneo a soddisfare, allo stesso tempo, il suo diritto a non morire (in quanto solo la terapia genica somatica possa sottrarre alla morte), e il suo diritto alla correzione di un grave difetto genetico che gli consenta il recupero della pienezza, naturale, sociale e giuridica, delle funzioni vitali compromesse (fondati in modo preminente sul diritto alla vita). La pretesa all'integrità genetica, che ordinariamente si presenta nella forma di un diritto negativo (a non essere sottoposto a manipolazioni genetiche), potrebbe esprimersi nel caso di specie, in forma positiva, come diritto a ottenere l'assistenza necessaria a raggiungere un'identità genetica liberata dalle minorazioni che ne hanno colpito la struttura.

A questo grumo di diritti non sembra possibile opporre, d'altra parte, alcuna eventualità, anche remota, che interessi di qualsiasi genere della collettività possano essere danneggiati a causa del loro esercizio. In particolare i biologi sembrano unanimi nell'escludere sia il rischio della possibile propagazione del retrovirus utilizzato per il trattamento di terapia genica alle cellule dello stesso paziente, sia quello della sua propagazione alle cellule di altri organismi con i meccanismi propri dell'infezione virale.

Dell'inesistenza di interessi, collettivi o generali, opponibili all'esercizio dei diritti indicati, offrono lineare conferma, d'altra parte, varie prese di posizione internazionali recentemente adottate sul tema della terapia genica somatica, tutte favorevoli all'effettuazione di questo tipo di trattamento, dalla raccomandazione rivolta ai Governi dei sette paesi più industrializzati dalla V Conferenza internazionale sulla bioetica (Roma, 1988), alle «Ethical considerations regarding the use of gene therapy» elaborate dalla British Medical Association nell'aprile del 1990 per il Committee on the ethics of gene therapy, istituito in Inghilterra, nel novembre del 1989, al recentissimo Avis sur la therapie genique adottato a Parigi il 13 dicembre del 1990 dal Comité consultatif national d'etique pour les sciences de la vie et de la santé.

Restano naturalmente altri vincoli da rispettare perché in concreto il trattamento possa considerarsi corretto come sarà precisato in seguito (vedi condizioni di accettabilità e misure di controllo). Fra questi vincoli, che non sempre hanno natura giuridica, almeno allo stato attuale di sviluppo dell'ordinamento, riveste importanza particolare quello relativo alla comparazione tra i possibili rischi e benefici dell'intervento. Al riguardo appare conforme a un quadro giuridico di riferimento centrato sulla priorità dei diritti del

malato, consentire che il paziente, o coloro ai quali spetta tutelarlo, possa lecitamente risolversi a chiedere l'effettuazione del trattamento anche quando le sue prospettive di successo, a giudizio dei sanitari responsabili, siano inferiori alle prospettive contrarie. Dovrà, tuttavia, essere garantito, in quest'ultima ipotesi, il diritto dei sanitari a non effettuare il trattamento. Infatti in linea di principio, non sussiste per il medico l'obbligo di utilizzare metodi che abbiano la caratteristica di tentativo sperimentale, per i quali il sanitario può non avere adeguata fiducia o sufficiente esperienza.

2.5. – *Condizioni di accettabilità e misure di controllo nella terapia genica somatica*

Considerato il rischio di un danno alla salute del soggetto trattato (ed in ipotesi alla discendenza) che un uso non appropriato delle tecniche del DNA ricombinante e delle biotecnologie cellulari può comportare, e tenuto conto anche dell'alto livello di sofisticazione delle tecniche a cui si fa ricorso, sembra opportuno attuare forme di controllo sia sul materiale che sui metodi e procedure seguite negli interventi in campo terapeutico.

Le misure da adottare potrebbero essere di tre tipi:

a) notifica alle autorità competenti dei protocolli usati nel trasferimento genico *in vivo* per quanto si riguarda le tecniche molecolari sia quelle cellulari;

b) valutazione da parte di una commissione di esperti della fattibilità dell'intervento sulla base del rapporto rischio-beneficio;

c) valutazione dell'idoneità delle strutture di laboratorio e della qualificazione scientifico-tecnica degli operatori da parte di organi preposti alla sanità pubblica.

Per l'accettabilità dell'intervento vanno verificate in particolare le seguenti condizioni:

1) il ricorso alla terapia genica è motivato dalla gravità della malattia e dalla mancanza di una terapia alternativa efficace e con effetti prolungati;

2) i risultati positivi dell'intervento sono plausibili e prevedibili in base ad un modello scientificamente valido;.

3) il gene trasferito è integrato stabilmente nella cellula bersaglio ed è funzionalmente attivo;

4) è nulla o trascurabile l'incidenza di effetti indesiderati dovuti all'interferenza del materiale genetico incorporato sull'attività di altri geni, alla sua diffusione in altri tessuti, in particolare nelle cellule della linea germinale, alla contaminazione dell'organismo, e tramite esso, dell'ambiente, con il vettore virale;

5) la sperimentazione *in vitro* o, quando possibile *in vivo*, sull'animale in prove a lungo termine, ha dato risultati positivi;

6) esiste il libero consenso del paziente o del suo rappresentante adeguatamente informato sulla natura dell'intervento; è garantita la riservatezza sul caso clinico ed al tempo stesso vengono resi noti la decisione di procedere all'intervento, previo parere del Comitato etico della struttura ospedaliera, ed i risultati della prova da pubblicare su riviste scientifiche specializzate;

7) vengono precisate le modalità di selezione quando esistono più pazienti per i quali sussiste l'indicazione per la terapia e viene assicurato il monitoraggio del paziente.

Su questi punti concordano la maggior parte delle leggi, raccomandazioni, risoluzioni, e proposte di organi consultivi e di governo di diversi Paesi come Stati Uniti, Repubblica Federale Tedesca, Svezia, Danimarca, Regno Unito, Australia e Organismi sovranazionali come Consiglio d'Europa e Parlamento Europeo (vedi documenti citati nella Bibliografia Generale).

CARATTERISTICHE DELLA TERAPIA GENICA NELLA MALATTIA DI IMMUNODEFICIENZA DA DEFICIT DI ADENOSIN-DEAMINASI (ADA)

1. – **Scopo della relazione**

La breve relazione che segue ha lo scopo di fornire alcuni elementi informativi specifici sui tentativi di terapia genica attualmente programmati presso l'Ospedale S. Raffaele di Milano e strettamente correlati con analoghi tentativi terapeutici in atto negli Stati Uniti presso il Clinical Center del NIH.

Questa relazione presuppone la previa acquisizione della relazione tecnico-scientifica.

2. – **Razionale della terapia genica nella immunodeficienza da deficit di adenosin-deaminasi (ADA)**

2.1. – *Cenni sul deficit di ADA*

Il deficit genetico dell'enzima Adenosina Deaminasi (ADA), scoperto nel 1972 da Giblett e coll., comporta una sindrome infantile letale che rappresenta una delle più frequenti forme di immunodeficienza grave combinata (severe combined immunodeficiency o SCID) ossia un deficit immunitario che interessa entrambi i compartimenti linfocitari B e T. Esso rappresenta infatti il 50 % delle forme autosomiche recessive di SCID ed il 20 % di tutte le forme di SCID. La gravità della sindrome deriva dal ruolo cruciale che la via di «ripescaggio» delle purine, in cui l'ADA rappresenta l'enzima chiave, riveste nella maturazione e nel funzionamento del sistema immune.

La sindrome è caratterizzata da linfopenia e dall'assenza di immunoglobuline non di origine materna e si accompagna a massive infezioni fungine virali e batteriche, all'arresto della crescita ed alla morte che sopravviene in genere, se la sindrome non è trattata, entro i primi mesi di vita o al massimo entro 1-2 anni.

La sindrome da deficit di ADA è anche nota come «bubble disease» per sottolineare la precarietà della vita di questi piccoli pazienti, costretti a vivere letteralmente in una cappa di vetro sterile onde evitare qualsiasi tipo di infezione, anche la più banale, che potrebbe provocarne la morte. Una terapia definitiva migliorerebbe non solo la sopravvivenza ma anche e soprattutto la qualità della vita di questi pazienti.

2.2. – *Terapia genica della linea germinale e di quella somatica*

Esistono in teoria due possibili tipi di terapie geniche, quelli rivolti a curare difetti genetici in cellule della linea germinale e quelli invece che si propongono di curare difetti molecolari al livello delle cellule somatiche. C'è consenso generale, che terapie geniche rivolte a cellule germinali umane sono assolutamente improponibili dal punto di vista etico. Per quanto riguarda invece gli esperimenti di terapia genica ristretti a cellule somatiche, quelli da considerare ai fini della proponibilità, sia dal punto di vista etico che scientifico, dovrebbero riguardare patologie che rispondano ai seguenti requisiti:

– Malattie dovute al difetto di un singolo gene strutturale recessivo (e quindi suscettibili di cura completa con introduzione anche di una sola copia del gene sano) ed espresso in cellule dotate di attività proliferativa.

– Malattie gravissime per cui l'aspettativa di sopravvivenza delle persone affette è nulla in condizioni di vita normale.

– Malattie per le quali non sono attualmente disponibili valide terapie alternative che comportino meno rischi di quelli prevedibili con la terapia genica.

Tra le malattie umane finora considerate come possibili candidati per terapie di cellule somatiche sono da annoverare:

– la fibrosi cistica
– la distrofia muscolare di Duchenne
– la deficienza di adenosina deaminasi (ADA)
– il deficit di purino-nucleoside fosforilasi (PNP)
– la sindrome di Lesch-Nyan
– l'emofilia A.

Di tutte queste malattie esiste infatti la disponibilità del gene normale, isolato e clonato in alcuni casi del tutto recentemente.

Tra le malattie sopracitate, presentano in partenza le maggiori possibilità di successo quelle che interessano i tessuti emopoietici perché in questi casi è possibile tentare la terapia su cellule staminali e quindi assicurare la produzione indefinita del prodotto del gene introdotto artificialmente.

In particolare, tra le malattie sopracitate, il deficit di ADA è quella ideale per una terapia genica in quanto, pur trattandosi di un difetto genico enzimatico generalizzato a tutte le popolazioni di cellule somatiche, tale difetto provoca le più importanti conseguenze al livello dei linfociti che sembrano essere le cellule maggiormente sensibili al deficit enzimatico.

Inoltre, poiché i linfociti sono cellule proliferanti sia *in vitro* che *in vivo*, nel caso del deficit di ADA è possibile effettuare la terapia genica addirittura utilizzando i linfociti del paziente affetto e non le cellule staminali (procedura quest'ultima ancora non molto efficiente nel caso di cellule staminali umane).

3. – **Schema generale della procedura e basi sperimentali di essa**

Il metodo generalmente utilizzato per effettuare la terapia genica consiste nelle seguenti tappe:

a) prelievo e coltura *in vitro* di cellule proliferanti dal paziente affetto;

b) introduzione nelle cellule coltivate *in vitro*, mediante opportune procedure, del gene sano;

c) reintroduzione delle cellule modificate geneticamente nel paziente affetto.

Nella relazione tecnico-scientifica sono chiarite le varie metodiche relative all'esecuzione del punto *b*). Nel caso del deficit di ADA il metodo utilizzato per trasferire il materiale genetico nell'interno delle cellule ha previsto l'utilizzazione di un retrovirus modificato geneticamente e contenente il gene d'interesse.

Pur essendo i retrovirus infatti, costituiti da RNA come materiale genetico, il loro peculiare ciclo vitale permette la trascrizione dell'RNA in DNA ad opera di un enzima, la trascrittasi inversa, che i retrovirus contengono nel loro involucro, e la successiva integrazione (generalmente casuale e in più copie) nel genoma della cellula ospite. Poiché l'efficienza di questo processo e anche l'espressione dei geni regolati dalle regioni di controllo

proprie dei retrovirus sono molto alte, il trasferimento genico mediato da retrovirus è quello attualmente maggiormente utilizzato.

Nel caso specifico di trasferimento genico per adenosin-deaminasi, esperimenti condotti con diversi costrutti retrovirali hanno già dimostrato la possibilità di ottenere cellule ematopoietiche staminali murine infettate *in vitro* con retrovirus ricombinante ed esprimenti sia *in vitro* che *in vivo* l'enzima umano (1-7).

Esperimenti di trasferimento genico similari hanno dimostrato la possibilità di introdurre il gene in cellule di midollo osseo di pecore e di scimmie e di ritrovare l'espressione del gene negli stessi animali re-inoculati *in vivo* con cellule autologhe (8). Gli stessi autori hanno anche dimostrato la possibilità di introdurre il gene con la stessa metodica in una linea T-linfocitica umana proveniente da un paziente affetto da deficit di ADA (8). Analoghi esperimenti condotti su linfociti T e B provenienti da pazienti affetti da deficit di ADA hanno dimostrato la possibilità di ottenere linee linfocitarie infettate con retrovirus e corrette per quanto riguarda la produzione di ADA (9).

Bordignon e coll. (10) hanno già dimostrato la possibiltà di infettare *in vitro*, con retrovirus contenente il gene corretto ADA, cellule midollari provenienti da pazienti affetti da deficit di adenosin-deaminasi.

Pertanto la terapia genica con il gene ADA, rispetto ad altre malattie suscettibili di terapia genica, presenta l'ulteriore vantaggio di essere il tipo di terapia genica per il quale è disponibile la più ampia sperimentazione con esito positivo effettuata sia *in vitro* con cellule umane sia *in vivo* in animali da esperimento.

4. – **Benefici della terapia genica: risultati attesi e confronto con terapie alternative**

Dal punto di vista teorico la terapia genica delle cellule staminali di pazienti affetti da deficit di ADA dovrebbe permettere la guarigione completa e permanente dei pazienti affetti a seguito di un singolo trattamento dei pazienti stessi con cellule autologhe modificate geneticamente *in vitro* con retrovirus.

Infatti l'introduzione del gene mediata da retrovirus assicura, come abbiamo visto, l'inserzione di più copie del genoma virale contenenti il gene ADA a caso nel genoma cellulare. Inoltre l'utilizzazione di cellule staminali provenienti dal midollo osseo dotate di capacità replicativa praticamente illimitata e capaci di dare origine, nella loro differenziazione maturativa, anche

alla linea linfocitaria (che è quella dove è essenziale la presenza dell'enzima ADA funzionante) lascia prevedere un'espressione ad alti livelli dell'enzima nel paziente reinoculato con le proprie cellule. Poiché la base della terapia è costituita dal fatto che si tratta di reintegrare il patrimonio genetico carente con il gene normale per ripristinare completamente la funzionalità dei linfociti, non ci sono dubbi che questo tipo di terapia è senz'altro destinata ad un successo totale.

Per quanto detto prima, la terapia delle cellule staminali umane presenta ancora qualche inconveniente ed è pertanto possibile in questo momento utilizzare la terapia della serie linfocitaria.

Poiché è possibile ottenere linfociti proliferanti sia *in vitro* che *in vivo*, sia la tappa della introduzione per infezione con retrovirus (che richiede proliferazione cellulare) sia quella dell'espressione continuata *in vivo* nel paziente sono assicurate anche da questa procedura.

L'unico inconveniente in questo caso è rappresentato dal fatto che, essendo i linfociti cellule terminali differenziate, il numero di replicazioni *in vivo* è molto limitato e pertanto per mantenere alti i livelli dell'enzima corretto, occorre re-introdurre periodicamente nel circolo sanguigno dei pazienti linfociti modificati geneticamente.

In ogni caso il confronto della terapia genica di deficit di ADA con le terapie attualmente esistenti è nettamente a favore della terapia genica.

Fino ad oggi, infatti, sono stati utilizzati tre diversi approcci terapeutici per il deficit di ADA:

a) trapianto di midollo osseo istocompatibile.

b) trasfusioni di eritrociti irradiati.

c) terapia enzimatica con ADA coniugata a polietilenglicole.

a) *Il trapianto di midollo osseo* ha rappresentato fino ad oggi la terapia scelta, soprattutto nei casi, che sono in genere meno della metà di quelli totali, in cui sia disponibile un fratello o una sorella istocompatibile. Il trapianto di midollo non identico ma con lo stesso aplotipo (ad es. di un genitore) benché abbia dato dei risultati positivi richiede maggior tempo per l'attecchimento.

Sembra inoltre che i pazienti con ADA-SCID siano più difficili da trattare con trapianto di midollo non identico, rispetto a pazienti con altre forme di SCID.

Infine va ricordato che anche quando il trapianto è perfettamente attecchito possono persistere difetti della funzione immunitaria, come è dimo-

strato dalle gravi infezioni, a volte mortali, ad opera di agenti quali il virus della varicella, cui possono andare incontro pazienti apparentemente trapiantati con successo.

Un recentissimo studio europeo (Lancet Oct. 6, 1990) sul follow up di 183 pazienti trattati mediante trapianto dal 1968 al 1989, ha mostrato che i pazienti trapiantati con midollo identico presentavano una sopravvivenza del 78 % (97 % in quelli trattati dal 1983) mentre quelli trapiantati con midollo non identico, depleto di cellule T, presentavano una sopravvivenza del 52 % anche se il condizionamento dei pazienti (con ciclofosfamide e/o busolfan) sembra migliorare notevolmente questa percentuale. Tuttavia non sono ancora noti esattamente i rischi connessi con questo condizionamento.

b) *Trasfusioni di eritrociti irradiati* – Gli eritrociti posseggono sia ADA che il sistema di trasporto dei nucleotidi. Essi sono quindi in grado di metabolizzare i composti tossici che si accumulano nel deficit di ADA e che sono i principali responsabili delle manifestazioni patologiche. Tuttavia si è osservato che mentre i livelli di metaboliti tossici si riducono notevolmente nei pazienti trattati con trasfusioni eritrocitarie, la competenza immunitaria viene riacquistata solo in misura modesta e per di più transitoria.

A ciò si aggiungono i danni causati dall'accumulo di ferro ed il pericolo di trasmissione di virus (HBV, HIV, etc.) attraverso la trasfusione.

c) *Terapia enzimatica* – La terapia enzimatica, effettuata con l'enzima ADA coniugato a polietilenglicole (PEG) è efficace perché l'enzima viene protetto dalla degradazione dalla presenza del PEG e poiché il fabbisogno enzimatico giornaliero è molto basso.

Tuttavia questo tipo di terapia non costituisce una cura permanente, a differenza della terapia genica e in più è una terapia costosa (60.000 dollari all'anno).

Il comitato della Food and Drug Administration americana interpellato a proposito della terapia genica di pazienti americani affetti da deficit di ADA per quanto riguarda il trattamento con PEG-ADA, ha adottato una risoluzione compromissoria, nel senso che i bambini che saranno sottoposti a terapia genica, riceveranno, in aggiunta, la sostanza PEG-ADA in quanto è sembrato non etico sottrarre i bambini al beneficio di questa sostanza che comunque fa migliorare la funzione immunitaria dei bambini compromessi e permette loro di condurre una vita pressoché normale.

In conclusione, pertanto, appaiono indubbi allo stato attuale i grandi vantaggi offerti dalla terapia genica rispetto alla terapia alternativa. È ipotizzabile che una risoluzione simile a quella presa dall'FDA americana (e cioè

della continuazione della terapia con PEG-ADA nei pazienti eventualmente sottoposti a terapia genica) rappresenti la terapia ottimale.

5. – **Precedente tentativo di terapia genica di deficit di ADA nell'uomo**

L'autorizzazione ad effettuare il primo tentativo di terapia genica è stata data negli Stati Uniti alle 8.52 di venerdì 14 settembre 1989 dalla FDA per effettuare un trapianto di cellule con gene per ADA in una bimba con sistema immune compromesso.

Le cellule umane modificate molecolarmente con il gene ADA esterno, sono stati linfociti ottenuti dalla stessa paziente.

I linfociti sono stati infettati *in vitro* con un retrovirus *difettivo per la replicazione* e contenente nel suo genoma il gene normale per l'ADA. Quattro ore dopo l'autorizzazione della FDA l'intervento è stato effettuato. La paziente, una bambina di 4 anni è stata reinoculata con le cellule linfocitarie proprie contenenti un gene ADA estraneo dal gruppo di Michael Blaese, Kenneth W. Culver e W. French Anderson del National Heart, Lung and Blood Institute dell'N.I.H. Risultati importanti circa l'esito di questa terapia si potranno conoscere tra un anno.

Analoga approvazione è stata data dalla FDA ad un esperimento di terapia genica ideato dal chirurgo Steven Rosenberg del N.C.I. e consistente nell'introduzione del gene per il Tumor Necrosis Factor, TNF, in una particolare categoria di linfociti, detti T.I.L. (Tumor Infiltrating Lymphocytes) prelevati da un paziente affetto da un tumore cutaneo altamente maligno (melanoma) e reinseriti nello stesso paziente affetto nella ipotesi che i linfociti TIL, ridistribuitisi naturalmente nella zona del tumore e diventati artificialmente produttori di TNF, una sostanza altamente tossica per il tessuto tumorale, potessero provocare una distruzione del melanoma maligno.

Questo tipo di esperimento è stato fatto su 5 pazienti affetti da melanoma e lo studio di Rosenberg e collaboratori riportato su The New England Journal of Medicine.

È importante sottolineare che il retrovirus contenente il gene normale per ADA utilizzato da French Anderson e collaboratori è un retrovirus difettivo per la replicazione. Questo retrovirus infatti è stato modificato non solo perché contiene un gene ad esso estraneo, ma anche perché sono stati eliminati dal suo genoma i tre geni necessari per la replicazione completa del retrovirus stesso e per la sua trasmissibilità all'esterno ad altre cellule ed eventualmente ad altri organismi. Il retrovirus, grazie alla presenza nel suo

involucro dell'enzima trascrittasi inversa (come proteina attiva e non come sequenza genica) ha la capacità di effettuare soltanto le prime due tappe della sua replicazione, e cioè la trascrizione dell'RNA genomico in due filamenti di DNA e la successiva integrazione del doppio filamento di DNA nel genoma dell'ospite. La produzione di nuove particelle virali e la fuoriuscita di esse dalle cellule infettate è impossibile.

6. – **Analisi dei possibili rischi della terapia genica in oggetto**

I rischi ipotizzabili da terapia genica effettuata con retrovirus sono essenzialmente quelli dovuti a mutagenesi da inserzione. È stato infatti dimostrato, particolarmente nel pollo, che retrovirus contenenti soltanto i geni necessari per la replicazione e non dotati di oncogène proprio, detti virus cronici, possono, con frequenza bassissima, provocare tumori negli stessi animali in seguito all'inserzione del retrovirus in vicinanza di un oncogène cellulare e a conseguente attivazione di esso. Gli elementi genetici responsabili di questa attivazione sono le regioni di controllo dei retrovirus, dette «Long Terminal Repeats» o LTR.

Queste sequenze presenti al 5' e 3' terminale del genoma virale, importanti per la trascrizione di geni presenti a valle e a monte di esse (quale è il caso del gene inserito per modificazione genetica, come l'ADA) potrebbero «accendere» un gene potenzialmente oncògeno che si trova in fase silente, cioè non trascritto, in quella particolare linea cellulare (linfociti differenziati) dove è stata inserita la sequenza retrovirale e provocare quindi un tumore di questa linea, cioè un linfoma.

Tale possibilità, in realtà piuttosto remota, è in effetti bilanciata dal fatto che tutti i pazienti portatori di deficit di ADA possono andare incontro allo sviluppo di linfoma, proprio in relazione alla loro situazione di deficit immunologico, situazione che favorisce enormemente lo sviluppo di linfomi. Inoltre è da sottolineare che anche i pazienti trattati con trapianto di midollo possono andare incontro allo sviluppo di linfomi. Un altro possibile rischio teorico è quello della perdita di un gene onco-soppressore dovuta all'inserimento del retrovirus contenente il gene ADA.

Questa eventualità, suggerita soprattutto dalle recenti acquisizioni sui geni onco-soppressori, rimane allo stato attuale una pura ipotesi neanche sostanziata da evidenze sperimentali come nel caso dell'attivazione di un oncogene da parte delle sequenze regolatrici LTR di retrovirus sopra menzionata.

Per quanto detto al paragrafo 5), totalmente inesistente è il rischio della possibile propagazione del retrovirus utilizzato per l'intervento di terapia genica sia alle altre cellule dello stesso paziente, sia ad altri organismi, con i meccanismi propri dell'infezione virale.

Infatti, come già menzionato, è del tutto impossibile per le cellule infettate *in vitro* poter produrre *in vitro* o *in vivo* progenie virale per la mancanza dei geni necessari al completamento dell'infezione che ha come tappa finale la fuoriuscita di virus.

In conclusione, quindi, non si riescono a intravedere rischi reali prevedibili in base alle attuali conoscenze scientifiche né per il paziente affetto da deficit di ADA né tantomeno per la comunità in generale.

7. – **Esame del caso programmato per la terapia genica di ADA e competenze tecniche professionali del gruppo di operatori**

Il caso programmato per la terapia genica a Milano è un tipico caso di deficit di adenosin-deaminasi, come risulta dalla caratterizzazione immunologica e clinica riportate. Pertanto esso rientra a pieno titolo nei casi di terapia genica secondo quanto illustrato nei paragrafi precedenti.

Una considerazione particolare merita la valutazione del gruppo di ricerca che ha proposto di effettuare l'intervento terapeutico.

Tale gruppo è diretto dal dott. Claudio Bordignon il quale ha effettuato una lunga serie di ricerche dapprima in Italia presso l'Istituto Mario Negri di Milano nel gruppo del prof. A. Mantovani e successivamente presso il Memorial Sloan Kettering Cancer Center di New York.

Come testimoniato da un'ampia produzione scientifica il dott. Bordignon ha acquisito una vasta esperienza nel campo dei trapianti di midollo osseo (11-13).

Successivamente durante il soggiorno negli Stati Uniti il dott. Bordignon ha collaborato con il dott. E. Gilboa, uno dei massimi esperti internazionali per la costruzione di vettori retrovirali, vale a dire di vettori necessari per l'ottenimento di retrovirus ricombinanti contenenti sequenze geniche desiderate nel contesto del genoma di retrovirus.

In collaborazione con il dott. Gilboa, il dott. Bordignon ha dato un contributo importante alla lunga fase sperimentale che ha preceduto e ha rappresentato la base per la sperimentazione della terapia genica del deficit di adenosina deaminasi.

Egli ha infatti contribuito alla dimostrazione della curabilità *in vitro* di cellule ematopoietiche umane (10) e agli studi di espressione di adenosin deaminasi in primati non umani sottoposti a trapianto di midollo autologo (14). Al suo rientro in Italia presso l'Ospedale S. Raffaele di Milano, il dott. Bordignon ha continuato ad operare nella direzione intrapresa negli Stati Uniti e volta al tentativo di terapia genica del deficit di adenosina deaminasi. Le sue ricerche più recenti hanno riguardato il tentativo di terapia genica sperimentale in un ceppo di topi portatori di un difetto genetico da immunodeficienza del tutto sovrapponibile al difetto di ADA. I risultati ottenuti dal dott. Bordignon, non ancora pubblicati, sono stati estremamente lusinghieri al punto di dimostrare il pieno successo di questa terapia sperimentale.

I risultati del dott. Bordignon, comunicati oralmente a Bethesda durante una riunione riguardante i tentativi di terapia genica per deficit di ADA sono stati determinanti per il rilascio dell'autorizzazione della FDA americana al dott. French Anderson ed alla sua equipe per eseguire il primo tentativo di terapia genica in un essere umano.

8. – **Considerazioni conclusive.**

In conclusione si può affermare che la procedura prevista di terapia genica con retrovirus ricombinante di linfociti da pazienti affetti da deficit di adenosin-deaminasi (ADA) è sicuramente promettente e dimostratasi efficace in tutte le prove sperimentali preliminari effettuate su animali *in vivo* (inclusi i primati non umani) e *in vitro* su cellule umane.

In tutte le prove sperimentali effettuate la procedura non ha provocato danni di sorta né sono prevedibili danni dall'applicazione della metodica a pazienti affetti. In pratica i pazienti saranno sottoposti a procedure paragonabili a quella di una comune trasfusione di sangue con esclusione dei possibili rischi di infezioni virali che sono ancora connessi con le trasfusioni, in quanto si tratterà di trasfondere cellule provenienti dallo stesso paziente.

I rischi paventati per i pazienti sono in realtà più teorici che reali e comunque uno dei rischi potenziali da prendere in considerazione è quello dello sviluppo di un linfoma, cioè di un tumore originato dai linfociti «curati». Tuttavia è da sottolineare che il rischio di sviluppare linfoma è attualmente molto elevato di per sé, nei pazienti non trattati o trattati con terapie tradizionali.

I rischi per persone a stretto contatto con il paziente o addirittura per la comunità in generale dovuti ad un'eventuale diffusione del retrovirus utilizzato per la terapia, sono del tutto inesistenti in quanto il retrovirus utiliz-

zato è un virus difettivo incapace di replicazione e quindi incapace di fuoriuscire dalle cellule linfocitarie in cui è stato introdotto.

Infine va sottolineato che, ad eccezione forse del trapianto con midollo identico, quando disponibile, della terapia con PEG-ADA, che comunque potrà essere usata contemporaneamente a quella genica, non esistono attualmente terapie alternative a quello che può essere considerato un male gravissimo incompatibile con una condizione di vita normale in assenza di una terapia potenzialmente risolutiva come la terapia genica.

BIBLIOGRAFIA GENERALE

ANDERSON, W.F. and FLETCHER, J.C., *Gene therapy in human being: when is it ethical to begin?* New Engl. J. Medicine **202**, 1292-1297, 1980.

ANDERSON, W.F. *Prospects for human gene therapy in the born and unborn patient.* Clinical Obstetrics Gynecol, **29**, 586-594, 1986.

APPERLEY, J.F., LIM, B., ORKIN, S.M., WILLIAMS, D.A. *Retroviral gene transfer of human adenosine deaminase complementary DNA into murine hemopoietic cells.* British J. Haematology **74**, p. 21 (1990).

BANKS, D.M. *Progress towards gene therapy.* Nature **333**, 19, 1988.

Board for Social Responsibility. Personal Origins. The report of a Working Party on Human Fertilization and Embriology, London, June 1985.

BRIAND, P. *Animal models of gene therapy.* J. Genet. Um. **37**, 289-298, 1989.

British Medical Association Memorandum of Evidence to the Committee on the Ethics of Gene Therapy. Ethical Considerations regarding the use of Gene Therapy, April 1990.

BROVEDANI, E. *Verso la terapia genica umana. Prospettive e implicazioni etiche.* Aggiornamenti sociali 9-10, 591-611, 1988.

Bundestag Tedesco. Rapporto della Commissione su Rischi e Prospettive della Ingegneria Genetica, 1987.

Comitato Svedese sulla Integrità Genetica. Riassunto di un rapporto, 1984.

Comité Consultatif National D'Ethique pour les Sciences de la Vie et de la Santé. Rapport sur la Therapie Genique. Doc. 1990.

Consiglio d'Europa. Raccomandazione 934, 1982.

CULLITON, B.J. *Gene Therapy: Research in Public.* Science 227, 493-496, 1985.

CUYAS, M. *Problematica etica della manipolazione genetica.* In «Rassegna di Teologia», n. 5, 471-497.

*Federal Register U.S.*50, 33463, Points to Consider. 1985.

FLETCHER, J.C. *Evolution of ethical debate about human gene therapy.* Human Gene Therapy **1**, 55-68, 1990.

FRIEDMANN, T. *Progress toward gene therapy.* Science **244**, 1275-1281, 1989.

HIRSCHHORN, R. *Therapy of Genetic Disorders.* New Engl. J. Medicine **16**, 623-624, 1987.

Human Gene Therapy. Background paper, OTA, December 1984.

INSTITUTE OF MEDICINE, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, AND AVE K. NICHOLS. *Human Gene Therapy.* Harvard University Press. 1988.

JONAS, H. *Ethics and Biogenetic Art.* Social Research **52**, 491-504, 1985.

JORDAN, B.R. *Basic principles of gene therapy. J. Genet. Hum* **37**, 283-188.

LEHN, P.M. *Gene therapy using bone marrow transplantation a 1990 update.* Bone Marrow Transplant. (England) **5**, 287-294, 1990.

LE ROY, W. *The ethics of human gene therapy.* Nature **320**, 225-227, 1986.

LYON, J. AND GORNER, P. *Altered Fates - The promise of Gene Therapy.* Chicago Tribune Co. 1986.

MILLER, A.D. *Progress Loward human gene therapy.* Blood **76**, 271-278, 1990.

MINISTERO DELLA SANITÀ. *Relazione della Commissione di Studio per l'Ingegneria Genetica.* 1987.

NATIONAL COUNCIL OF THE CHURCHES OF CHRIST IN THE UNITED STATES OF AMERICA. *Genetic Science for Human Benefit. Adopted hy the Governing Board,* May 1986.

NATIONAL HEALTH AND RESEARCH COUNCIL. *Ethical aspects of research on human therapy. Report of the NHMRC by the Medical Research Ethics Committee of NHMRC, Australian Government Publishing Service,* Canberra 1987.

NOLAN, K. AND SWENSON, S. *New tools, new dilemmas: genetic frontiers. In: "The Hasting Center Report",* **18**, p. 40-46, October/November 1988.

PARLAMENTO EUROPEO. *Risoluzione (doc. A2-327/88) sui problemi etici e giuridici della manipolazione genetica.* 1989.

PRESIDENT'S COMMISSION FOR STUDY OF ETHICA. *Problems in Medicine and Biomedical and Behaviour Research. Splicing Life: The social and ethical issues of genetic engincering with human being.* USA, November 1982.

ROBERT, J.M. *15th European Congress of Genetic Counselling Second Part. Gene Therapy, Ajaccio, France, September 14-17, 1989.* J. Genet. Hum. (*Switzerland*) **37**, n. 4-5, 1989.

ROSENBERG, S.A., ACHERSOLD, P., CORNETTA, K., ANDERSON, F. *Gene transfer into humans. Immunotherapy or patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral genes transduction.* New England J. Med. **323**, 570-578.

VAISMAN, B.L., DYBAN, A.P. *Possibilitics of using the advances of mammalian gene engineering for elaboration og gene therapy mothods.* Biopolim, i Kletka (USSR) **6**, 3-12, 1990.

VERTICE DEI 7 PAESI PIÙ INDUSTRIALIZZATI. *5ª Conferenza sulla Bioetica* (Roma 10-15 1988). Rapporto Finale.

WEATHERALL, D.F. *Gene Therapy,* British Medical J., 18 March 1989.

WILSON, J.M., BIRINYI, L.K., SALOMON, R.N., LIBBY, P., CALLOW A.D., MULLIGAN, R.C. *Implantation of vascular grafts lined with genetically modified endothelial cells.* Science **244**, 1344-1346, 1989.

WOLF, J.A., MALONE, R.W., WILLIAM, P., CHONG, W., ACSADI, G., JANI A., FELGNER, P.L. *Science* **247**, 1465-1468, 1990.

YU, S.F., RUDEN, T.V. KANTOFF, P.W. et al. *Self-inactivation retroviral vectors designed for transfer of wole genes into mammalian cells.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 3194-3198, 1986.

ARTICOLI ORIGINALI

ANDERSON, W. F., *Prospects for Gene Therapy*. Science **226**, 401-409, 1984.

ANONYMOUS - *Cystic Fibrosis: toward the ultimate therapy, slowly*. The Lancet **337**, 1224-1225.

APPERLEY, J. F., WILLIAMS, D. A. *Gene therapy current status and future directions*. British J. Haematology **75**, p. 148-155, 1990.

ARMENTANO, D., YU, S. F., KANTOFF, P. W., VON RUDEN, T., ANDERSON, W. F., GILBOA, E., J. VIROL. **61**, 1647-1650, 1987.

BELMONT, J. W., MACGREGOR, G. R., WAGER-SMITH, K., FLETCHER, F. A., MOORE, K. A., HAWKINS, D., VILLALON, D., CHANG, S. M. W., CASKEY, C. T. *Expression of human adenosine deaminase in murine hematopoietic cells*. Mol. Cell. Biol. **8**, 5116-5125, 1988.

BENDER, M.A., GELINAS, R.E. and MILLER, A.D. *A majority of mice show long term expression od a human β-globin gene after retrovirus transfer into hematopoietic stem cells*. Mol. Cell. Biol. **9**, 1426-1434, 1989.

BORDIGNON, C., YU, S.-F., SMITH, C.A., HANTZOPOULOS, P., UNGERS, G., KEEVER. C.A., O'REILLY, R.J., GILBOA, E. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**, 6748-6752, 1989.

BROXMEYER, H. E., DOUGLAS, G. W., HANGOC, G., COOPER, S., BARD, J., ENCLIGH, D., ARNY, M., THOMAS, L., BOYSE, E. A. *Human ombilical cord blood as a potential source of translatable hematopoietic system*. Progenitor cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**, 3828-3832, 1989.

CHASSE, J. F., LEVRERO, M., KAMOUN, P., MINET, M., BRIAND, P., PERRICAUDET, M. *L'adénovirus: vecteur de thérapie génétique?* Médicine Sciences **5**, 331-337, 1989.

CRYSTAL, R. G., ROSENFELD, M., SLEGFRIED, W., and LE COCQ, J. P. *New viral transfer systems pediatric pulmonology*. 1990 North American Cystic Fibrosis Conference, Arlington, Virginia, Oct. 3-6, 1990.

DAVIS, B. D. *Limits to genetic intervention in humans somatic and germline*. CIBA Found. Symp. p. 81-92, 1990.

DUBENSKY, T. W., CAMPBELL, B. A. and VILARREAL, L. P. *Direct transfection of viral and plasmid DNA into the liver or spleen of mice.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 7529-7533, 1984.

ENGLAND, S. B., NICHOLSON, L. V. B., JOHNSON, M. A., FORREST, S. M., LOVE, D. R., ZUBRZYCKA-GAARN, E. E., BULMAN, D. E., HARRIS, J. B., DAVIES, K. E. *Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin.* Nature **343**, 180-182, 1990.

European Medical Research Councils, Recommendations of. "Gene Therapy in Man". The Lancet, 4 June 1988.

FARAJI-SHADAN, F., STUBBS, J. D., BOWMAN, P. D. *A putative approach for gene therapy against human immunodefinciency virus HIV.* Med Hipotheses **32**, 81-84, 1990.

GAITSKHOKI, V. S. *Molecular heterogeneity of human hereditary diseases and problems of their gene therapy.* Biopolim. Kletka (URSS) **6**, 31-46, 1990.

GRIDLEY, T., SORIANO, P., and JAENISCH, R. *Insertional mutagenesis in mice.* TIG **3**, 162-166, 1987.

HANTZOPOULOS, P., SULLENGER, B. A., UNGERS, G., GILBOA, E. *Improved gene expression upon transfer of the adenosine deaminase minigene outside the transcriptional unit of a retroviral vector.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**, 3519-3523, 1989.

HOCK, R. A., MILLER, A. D., OSBORNE, W. R. A. Blood **74**, 876-881, 1989.

HOEBEN, R. C., VAN DER JAGT, R. C. M., SCHOUTE, F., VAN TILBURG, N. H., VERBEET, M. P., BRIET, E., VAN ORMONDT, H., VAN DER EB, A. J. *Espression of functional factor VIII in primary human skin fibroblasts after retrovirus mediated gene transfer.* J. Biol. Chem. **265**, 7318-7323, 1990.

JASIN, M. and BERG, P. *Homologous integration in mammalian cells withour target gene selection.* Gen. Dev. **2**, 1353-1363, 1988.

KANTOFF, P. W., FREEMAN, S. M., ANDERSON, W. F. Ann. rev. Immunol. **6**, 581-594, 1988.

KANTOFF, P. W., GILLIO, A. P., MCLACHLIN, J. R., BORDIGNON, C., EGLITIS, M. A., KERNAN, N. A., MOEN, R. C., KOHN, D. B., YU, S. F., KARSON, E., KARSON, S., ZWIEBEL, J. A., GILBOA, E., BLAESE, R. M., NIENHUIS, A. E., O'REILLY, R. J., ANDERSON, W. F. J. exp. Med. **166**, 219-234, 1987.

KANTOFF, P. W., KOHN, D. B., MIYSUYA, H. et al. *Correction of adenosine deaminase deficiency in cultured human T and B cells by retrovirus mediated gene transfer.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 6563-6567, 1986.

KOENIG, M., HOFFMAN, E. P., BERTELSON, C. J., MONACO, A. P., FEENER, C., KUNKEL, L. M. Cell **50**, 509-517, 1987.

KOHN, D. B., KANTOFF, P. W. Transfusion **29**, 812-819, 1989.

KORDYUM, V. A. *Potential benefits of gene therapy for the treatment and prevention of mass pathologies.* Biopolim. Kletka (URSS) **6**, 12-31, 1990.

KYLE, J. W. BIRKENMEIER, E. H., GWYNN, B., VOGLER, C., HOPPE, P. C., HOFFMANN, J. W., SLY, W. S. *Correction of murine mucopolysaccharidosis VII by a human beta glucuronidase transgene.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**, 3914-3918, 1990.

LANDER, E. S. LODISH, H. *Mitochondrial diseases gene mapping and gene therapy.* Cell **61**, 925-926, 1990.

LEMARCHADEL, V., MONTAGUTELLI, X. *Homologous recombination new approaches to transgenesis in mammals.* M-S (Medicine Sciences) (France) **6**, 18-29, 1990.

LI, C. L., DWARKI, V. J., VERMA, I. M. *Expression of human alpha-globin and mouse-human hybrid beta globin genes in murine hemopoietic stem cells transduced by recombinant retrovirus.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**, 4349-4353, 1990.

MONACO, A. P., NEVE, R. L., COLLETTI-FEENER, C., BERTELSON, C. J., KURNIT, D. M., KUNKEL, L. M. Nature **323**, 646-650, 1986.

MORGAN, J. R., BARRANDON, Y., GREEN, H., MULLIGAN, R. *Expression of an escogenous growth hormone gene by transplantable human epidermal cells.* Science **237**, 1476-1479, 1987.

MOSCA, J. D., RITCHEY, D. W., D'ARCY, L. A., BURKE, D. S. *Expression of anti-HIV compounds directed from the HIV-LTR; a potential gene therapy for HIV infected individuals.* Sixth Intern. Conference on AIDS, Univ. of California, San Francisco, 1990.

MOSIER, D. E., GULIZIA, R. J., BAIRD, S. M., WILLIAMS, D. B. Nature **335**, 256-259, 1988.

NABEL, E. G., PLAUTZ, G., BOYCE, F. M., STANLEY, J. C., NABEL, G. J. *Recombinant gene expression* in vivo *within endothelial cells of the arterial wall.* Science **244**, 1342-1344, 1989.

NOLTA, J. A., KOHN, B. B. *Highly efficient gene transfer by a retroviral vector into human hematopoietic cells.* Exp. Hematol. **18**, 617, 1990.

NOVAK, U., HARRIS, E. A. S., FORRESTER, W., GROUDINE, M., GELINAS, R. *High-level beta globin expression after retroviral transfert of locus activation region-containing human beta globin gene derivatives into murine erythroleukemia cells.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**, 3386-3390, 1990.

OHI, S., DIXIT, M., TILLERY, M. K., PLONK, S. G. *Costruction and replication of an adeno-associated virus expression vector that contains human beta globin complementary DNA.* Gene **89**, 279-282, 1990.

RUSSELL, S. J. *Lymphokine gene therapy for cancer.* Immunology Today **11**, 196-200, 1990.

SAYER, H. G., SCHUENING, F. G., MILLER, A. D, STORB, R. *Canine marrow stromal fibroblasts culture conditions and retroviral gene transfer experiment in vitro.* Exp. Hematol. **18**, 618, 1990.

SELDEN, R., SKOSKIEWCZ, M. J., HOWIE, K. B., RUSSEL, P. S., GOOD, H. M. *Implantation of genetically engineered fibroblasts into mice: implications for gene therapy.* Science **236**, 714-718, 1987.

SHVARTSMAN, A. L., STRAKHOVA, M. P., GAITSKHOKI, V. S., BERGER, V., KUTEL, *DNA diagnosis and approaches to gene therapy of hereditary alpha-1 antitripsin deficiency.* Biopolim. Kletka (URSS) **6**, 51-56, 1990.

SMITH, B. F., HOFFMAN, R. K., GIGER, U., WOLFE, J. H. *Genes transferred by retroviral vectors into normal and mutant myoblasts in primary cultures are expressed in myotubes.* Molec. Cell. Biol. **10**, 3268-3271, 1990.

SMITHIES, O., GREGG, R. G., BOGGS, S. S., KORALEWSKI, M. A., KUCHER-LAPARI, R. S. *Insertion of DNA sequences into human chromosomal beta-blobin locus by homologous recombination.* Nature **317**, 230-234, 1985.

ST-LOUIS, D., VERMA, I. M. *An alternative approach to somatic cell gene therapy.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 3150-3154, 1988.

THOMAS, E. D. *Marrow transplantation and gene transfer as therapy for hematopoietic diseases.* Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biology **LI**, 1009-1012, 1986.

WEINTHAL, J., NOLTA, A. J., URIBE, L., BAHNER, I., YU, X.-J., KHON, D. B. *Expression of human glucocerebrosidase in hematopoietic cells by retroviral vectors. Exp. Hematol. (New York, US)* **18**, 625, 1990.

GLOSSARIO

Acidi Nucleidi: macromolecole biologiche lineari contenenti l'informazione genetica sotto forma di sequenze di nucleotidi.

Allele: forme alternative di un gene presente in un determinato locus.

Clone: insieme di frammenti di DNA, anonimi o corrispondenti a geni o a parti di essi, derivati per duplicazioni successive da una singola copia iniziale. Il termine si applica anche a popolazioni o colonie di cellule geneticamente identiche, derivate per divisione equazionale da una singola cellula progenitrice.

Cromosoma: filamento di DNA (acido nucleico) nudo (nei virus e nei batteri) o associato a proteine ed organizzato in una struttura complessa (in lieviti, funghi ed organismi superiori); presente nella cellula o nel nucleo cellulare, in una o più unità, sulle quali sono allineati i geni; negli organismi superiori il corredo cromosomico è formato da coppie di elementi omologhi provenienti da due genitori.

DNA ricombinante: una nuova sequenza di DNA prodotta artificialmente riunendo frammenti di DNA provenienti da diversi organismi.

Dominanza: prevalenza, nella manifestazione di un carattere, dell'effetto di un allelo su quello di un altro allelo nello stesso locus sul cromosoma omologo.

Eterozigote: individui con due alleli diversi, uno dominante sull'altro o ambedue espressi (co-dominanti), presenti nel medesimo locus di due cromosomi omologhi.

Gamete: cellula sessuale, uovo o spermatozoo.

Gene: tratto di DNA sul cromosoma, con la funzione di stampo per una proteina, da cui dipende uno specifico carattere, o per un altro acido nucleico necessario per la sintesi delle proteine.

Genoma: insieme di tutte le sequenze codificanti (geni) e non codificanti allineate sul(i) cromosoma(i) di un organismo.

Ingegneria genetica: complesso di principî metodologie e di procedimenti tecnici per l'analisi, la sintesi e la modificazione di geni e di genomi, mediante determinazione delle sequenze nucleotidiche, isolamento e transferimento di frammenti di DNA, entro uno stesso organismo o tra organismi diversi.

Linea cellulare: cellule derivate da vari tessuti, che hanno acquisito la capacità di crescere indefinitamente in colture *in vitro*.

Liposomi: vescicole lipidiche prodotte artificialmente in grado di caricare e trasportare all'interno della cellula diverse macromolecole biologiche, compreso il DNA cromosomico.

Locus: sito del cromosoma in corrispondenza del quale è localizzato un gene (vedi).

Manipolazione genetica: modificazione indotta, in particolare, con tecniche molecolari nel materiale ereditario per il miglioramento genetico di organismi utili all'uomo o per fini terapeutici.

Mutazione: cambiamento ereditabile nella molecola del DNA.

Nucleotide: subunità chimica di cui sono composti gli acidi nucleici, DNA ed RNA.

Plasmide: forma circolare autoreplicante di DNA, presente in altre specie di batteri, utilizzabile come vettore per il trasferimento di geni ricombinati in altre specie.

Omozigote: individuo con alleli identici, nel medesimo locus, sui due cromosomi omologhi.

Recessività: mancata espressione di un allele, in presenza di un altro allele allo stesso locus sul cromosoma omologo, capace di manifestarsi in un carattere.

Retrotrascrizione: processo inverso nella trasmissione dell'informazione genetica: sequenze di DNA vengono sintetizzate sullo stampo dell'RNA.

Ricombinazione: scambio di DNA tra cromosomi omologhi o tra regioni omologhe di genomi.

Trasduzione: trasferimento di materiale genetico mediato da virus.

Trasfezione: trasferimento di sequenze di DNA o di RNA-stampo, isolate o legate a particelle autoreplicanti.

Trasformazione genetica: induzione stabile di un carattere per incorporazione di materiale genetico.

Vettore: plasmide, virus o altro veicolo usato per trasportare un frammento di DNA in una cellula di un'altra specie.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI [1]

LIM B., WILLIAMS D.A. and ORKIN S.H., *Retrovirus mediated gene transfer of human adenosine deaminase: espression of functional enzyme in murine hematopoietic stem cells in vivo.* Mol. Cell. Biol. **7**, 3459-4365, 1987.

VAN BAUSECHEM V.W., KUKLER A., EINERHAND M.P., BAKY T.A., VAN der EB A.J., VAN BEKKUM D.W. and VALERIO D., *Expression of human adenosine deaminase in mice transplanted with hematopoietic stem cells infected with amphotropic retroviruses* J. exp. Med., **172**, 729-736, 1990.

KALEKO M., GARCIA J.V., OSBORNE W.R. and MILLER A.D., *Expression of human adenosine deaminase in mice after transplantation of genetically modified bone marrow Blood* **75**, 1733-1741, 1990.

MOORE K.A., FLETCHER F.A., ALFORD R.L., VILLALON D.K., HAWKINS D.H., MAC GREGOR G.R., COSKEY C.T. and BELMONT J.W., *Expression vector for human adenosine deaminase genetherapy Genome* **31**, 832-835, 1989.

LIM B., APPERLY J.F., ORKIN S.H., WILLIANS D.A., *Long term expression of human adenosine deaminase in mice transplanted with retrovirus infected hemopoietic stem cells.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **86**, 8892-8896, 1989.

WILSON J.M., DANOS O., GROSSMAN M., RAULET DOTT. and MULLIGAN R.C. *Expression of human adenosine deaminase in mice reconstituted with retrovirus-transduced stem cells.* Proc. Nat. Acad. Sec. USA, **87**, 439-443, 1990.

KALEKO M., GARCIA J.V., OSBORNE W.R.A. and MILLER A.D., *Expression of human adenosine deaminase in mice after transplatation of genetically modified bone marrow.* Blood **75**, 1733-1741, 1990.

KOHN D.B., KANTOFF P.W., EGLITIS M.A., MC LACHLIN J.R., MOEN R.C., KARSON E., WWIEBEL J.A., NIENHUIS A., KARLSSON S., O'REILLY R. et Al., *Retroviral mediated gene transfer into mammalian cells Blood cells* **13**, 285-298, 1987.

[1] In ordine di citazione nel testo.

KANTOFF P.W., KOHN D.B., MITSUYA H., ARMENTANO D., SIEBERG M. et Al., *Correction of adenosine deaminase deficiency in cultured human T and B cells by retrovirus mediated gene transfer* Proc. Nat. Acad. Sci. USA **83**, 6563-6567, 1986.

BORDIGNON C., YU S.F., SMITH C.A., HANTZOPOULOS P., UNGERS G.E., KEEVER C.A., O'REILLY and GILBOA F., *Retroviral vector mediated high efficiency expression of adenosine deaminase (ADA) in hematopoetic long-term cutures of ADA deficient marrow cells.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA **86**, 6748-6752, 1989.

KERNAN N.A., BORDIGNON C., HELLER G. CUNNINGHAM I., CASTRO-MALASPINA H., SHANK B., FLOMENBERG H., BURNS J., SOO Y.Y., BLACK P. COLLINS N.H., O'REILLY R.J., *Graft failure after T-cell depleted human leukocyte antigen identical marrow transplants for leukemia I: Analysis of risck factors and results of secondary transplants.* Blood **74**, 2227-2236, 1585.

BORDIGNON C., KEEVER C.A., SMALL T.N., FLOMENBERG N. DUPONT B. O'REILLY R.J. and KERNAN N.A., *Graft failure after T cell depleted human leukocyte antigen identical marrow transplants for leukemia. II: In vitro analysis of host effector mechanisms* Blood **74**, 2237-2243, 1989.

HANCH M. GAZZOLA M.V., SMALL T., BORDIGNON C. BARNETT L., CUNNINGHAM I., CASTRO-MALASPINA H., O'REILLY R.J. and KEEVER C.A., *Anti-leukemia potential of interleukin-2 activated natural killer cells after bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia.* Blood **75**, 2250-2262, 1990.

KANTOFF P.W., GILLIO A.P., MCLACHLIN J.R., BORDIGNON C. EGLITIS W.A., KERNAN N.A., MOEN R.C., KOHN D.B., SHAGN F.Y., KARSON E., KARLSSON S., SWIEBEL J.A., GILBOA E., BLEASE R.M., NEINHUIS A., O'REILLY R.J. and FRENCH ANDRESON W. *Expression of human adenosine deaminase in non human primates after retrovirus mediated gene transfer.* J. Exp. Med. **166**, 219-234, 1987.

MEMBRI DEL COMITATO NAZIONALE PER LA BIOETICA

Prof. Bompiani Adriano - *Presidente*
Ordinario di Clinica ostetrica e ginecologica

Prof. Ossicini Adriano - *Vice Presidente*
Ordinario di Psicologia

Prof. Scarpelli Uberto - *Vice Presidente*
Ordinario di Filosofia del diritto

Prof.ssa Levi Montalcini Rita
Membro Professore «ospite»

Cons. Barberio Corsetti Livia
Consigliere di Stato

Prof. Barni Mauro
Ordinario di Medicina Legale

Prof. Carenza Luigi
Ordinario di Clinica ostetrica e ginecologica

Prof. Cattorini Paolo
Responsabile Scuola di Medicina e Scienze Umane

Prof. Chieffi Giovanni
Ordinario di biologia generale

Prof. Cittadini Ettore
Ordinario di Clinica ostetrica e ginecologica

Prof. D'Agostino Francesco
Ordinario di Filosofia del diritto

Prof. Dalla Torre Giuseppe
Ordinario di Diritto ecclesiastico

Prof. De Carli Luigi
Ordinario di genetica umana

Prof. Dioguardi Nicola
Ordinario di Clinica medica

Prof. Fegiz Gianfranco
Ordinario di Clinica chirurgica

Prof. Fiori Angelo
Ordinario di Medicina legale

Prof. Flamigni Carlo
Ordinario di Endocrinologia ginecologica

Prof. Frati Luigi
Ordinario di Medicina sperimentale

Prof. Giorello Giulio
Ordinario di Storia della scienza

Prof. Irti Natalino
Ordinario di Diritto privato

Prof. Isidori Aldo
Ordinario di Andrologia

Prof. Lecaldano Eugenio
Ordinario di Storia delle dottrine morali

Prof. Manni Corrado
Ordinario di Anestesiologia e rianimazione

Prof. Manzoli Francesco Antonio
Direttore Istituto Superiore di Sanità

Prof. Merli Silvio
Ordinario di Medicina legale

Prof. Nordio Sergio
Ordinario di Pediatria

Prof. Paoletti Rodolfo
Ordinario di Farmacologia

Prof. Parodi Eolo
Presidente Federazione Nazionale Ordine dei Medici

Prof. Rescigno Pietro
Ordinario di diritto civile

Prof. Romano Carlo
Ordinario di Medicina legale

Prof. Rossi Bernardi Luigi
Presidente del Consiglio Nazionale delle Ricerche

Prof.ssa Rossi Sciumè Giovanna
Ordinario di Sociologia della Famiglia

Prof. Salvatore Gaetano
Ordinario di Patologia generale

Prof. Sgreccia Elio
Ordinario di Bioetica

Prof. Silvestrini Bruno
Ordinario di Farmacologia

Prof. Stammati Sergio
Ordinario di Diritto pubblico

Prof. Terragni Fabio
Biologo

Prof. Tocchini-Valentini Glauco
Biologo

Prof. Veronesi Umberto
Direttore Generale Istituto Nazionale Tumori

Prof. Zannini Giuseppe
Presidente Consiglio Superiore di Sanità

Sede del Comitato Nazionale per la Bioetica
Via dei Villini, 13 - 00161 Roma – Telefono: Presidente 44.04.279 - Segreteria (e fax) 44.04.282
Fanno parte della Segreteria, la signorina Franca Barrano e la signora Colomba Malerba.

DPCM 28 marzo 1990 «Istituzione del Comitato Nazionale per la Bioetica»

In copertina: Fotomontaggio di Francesco Cascioli.