

Terapie geniche non virali: la nuova frontiera della medicina molecolare

Basate su vettori chimici o fisici che trasferiscono il DNA senza l'uso di virus modificati, le terapie geniche non virali offrono un approccio più sicuro e versatile, aprendo nuove possibilità di cura per malattie genetiche rare e comuni.

DOI 10.12910/EAI2025-067

di Doriana Triggiani, Emanuela Pasquali, Caterina Merla, Rosella Franconi – Dipartimento Sostenibilità, circolarità e adattamento al cambiamento climatico dei Sistemi Produttivi e Territoriali, Divisione Biotecnologie, Laboratorio Biotecnologie RED – ENEA

La **terapia genica** rappresenta una delle più promettenti innovazioni della medicina molecolare. Il suo principio si basa sull'introduzione nelle cellule di sequenze di DNA funzionali in grado di compensare o sostituire geni difettosi. Le prime applicazioni, sviluppate con vettori di origine virale (ad esempio, i virus adeno-associati, AAV) hanno aperto la strada a nuovi approcci terapeutici, molti dei quali in fase di studio clinico ed alcuni approvati. Tuttavia, questi sistemi presentano ancora limiti tecnici e biologici: la capacità di trasportare solo piccoli frammenti di DNA, costi di produzione elevati e potenziali reazioni immunitarie. Da qui l'interesse crescente verso **terapie geniche non virali**, che mirano a ottenere simili risultati in modo più sicuro ed economico.

Cosa significa "non virale"

Le terapie geniche non virali si basano su metodi fisici o chimici per introdurre materiale genetico nelle cellule, evitando l'impiego di virus modificati. Tra questi approcci rientrano (fig. 1):

- l'utilizzo di plasmidi sintetici, ossia piccole molecole circolari di DNA che contengono la sequenza terapeutica;
- sistemi di veicolamento basati su nanoparticelle lipidiche o polimeriche, che proteggono il DNA e ne favoriscono l'ingresso nella cellula;

- tecniche fisiche controllate, come l'elettroporazione che, aumentando temporaneamente la permeabilità selettiva della membrana cellulare, facilitano l'internalizzazione delle molecole terapeutiche di DNA esogene.

Rispetto ai vettori virali, questi approcci offrono il vantaggio di una produzione più semplice, un minor rischio di risposte immunitarie, la possibilità di trasportare sequenze più lunghe di DNA e di ripetere la somministrazione nel tempo (fig. 2). Gli svantaggi principali riguardano la minore efficienza di trasferimento e la necessità di ottimizzare protocolli

specifici per ciascun tipo di tessuto.

Il contributo di Laboratorio Biotecnologie RED

Presso i laboratori SSPT-BIOTEC-RED è in corso da diversi anni un'attività di ricerca volta a sviluppare e validare una piattaforma di **terapia genica non virale** verso la **Glicogenosi di tipo III (GSDIII)**, una malattia genetica rara dovuta al difetto dell'enzima derivante dal glicogeno (GDE), essenziale per il corretto metabolismo degli zuccheri. Quando questo enzima è assente o non funziona, il glicogeno si accumula in modo anomalo nei tessuti colpiti provocando ingrossamen-

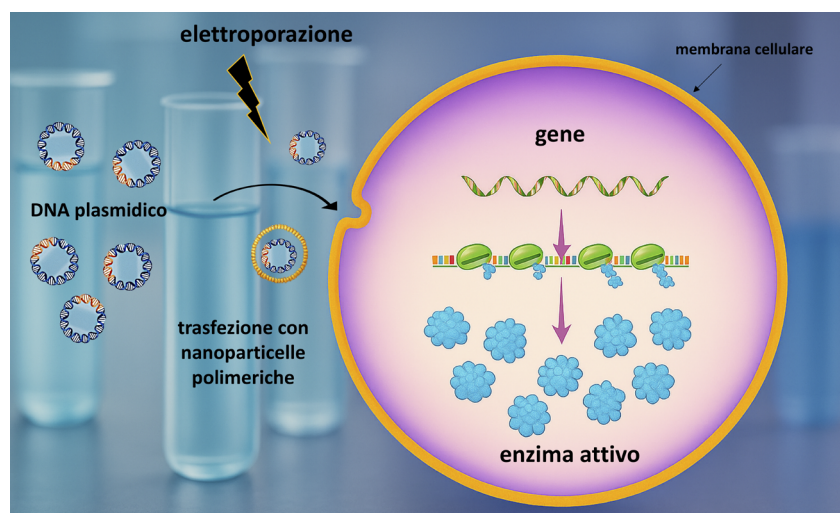


Figura 1 - Schema semplificato del trasferimento non virale di un gene, mediato da nanoparticelle polimeriche o elettroporazione, per la produzione di un enzima (es. GDE) in una cellula.

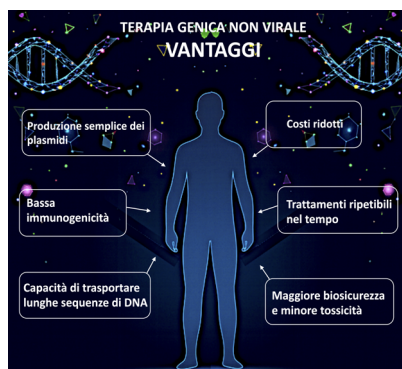


Figura 2 - Vantaggi della terapia genica non virale.

to del fegato, debolezza muscolare e problemi cardiaci di diversa gravità. L'attività di ricerca si fonda su un **gene sintetico brevettato da ENEA** ^[1], ottimizzato per essere espresso in cellule umane e capace di codificare una forma funzionale dell'enzima GDE mancante. Per migliorare l'ingresso del DNA nelle cellule, i ricercatori ENEA stanno sperimentando l'utilizzo di nanoparticelle o metodi di trasferimento fisico, in particolare l'elettroporazione, utilizzando impulsi elettrici per formare pori temporanei nella membrana cellulare, consentendo l'ingresso del plasmide terapeutico. Anche grazie al finanziamento ENEA **Proof of Concept (PoC)** 2018 ¹, le prove sperimentali condotte in sistemi batterici, in linee cellulari umane (incluse quelle derivanti da pazienti) e in muscoli di animali da laboratorio, hanno dimostrato che il gene sintetico, inserito in una picco-

la molecola di DNA circolare (plasmide), è in grado di produrre l'enzima in una forma attiva ^[2-3]. Questi risultati confermano la validità e le potenzialità dell'approccio adottato. Inoltre, il trasferimento genico diretto nel muscolo, potenziato, dall'applicazione di campi elettrici, potrebbe rappresentare una possibile terapia genica specifica, locale, sicura e a basso costo per la GSDIII con alcuni vantaggi rispetto alla terapia genica basata su vettori virali quali una maggiore sicurezza, costi minori e trattamenti localizzati ripetibili nel tempo.

Progetti in corso

Gli esperimenti attualmente in corso hanno l'obiettivo di individuare le condizioni ottimali che garantiscano un buon equilibrio tra efficienza del metodo e vitalità cellulare, sia per applicazioni su strutture cellulari tridimensionali che in tessuti più complessi, come quello muscolare. Nell'ambito di un progetto **Proof of Concept** ² finanziato da ENEA, la ricerca è focalizzata sull'identificazione di protocolli di elettroporazione, sempre più efficaci e non invasivi, volti a migliorare l'efficienza di trasferimento del plasmide nei tessuti muscolari riducendo al minimo gli effetti indesiderati associati alla procedura. Inoltre, le attività di ricerca future saranno sostenute anche grazie ai **fondi del 5×mille** ³ **destinato alla ricerca ENEA per l'anno 2025**, che per-

metteranno di ampliare gli studi sulle strategie non virali e di consolidare le collaborazioni con laboratori e associazioni di pazienti, come l'Associazione Italiana Glicogenosi con cui l'ENEA collabora fin dal 2015. L'obiettivo finale sarà ottimizzare le metodologie di trasferimento genico mediante nanoparticelle polimeriche e validare la piattaforma sperimentale su modelli cellulari tridimensionali, contribuendo così alla definizione di un modello terapeutico sostenibile e accessibile.

Una prospettiva realistica per le malattie rare

Le terapie geniche non virali sono ancora in una fase sperimentale, ma offrono prospettive concrete per superare i limiti dei vettori tradizionali. I risultati ottenuti indicano che è possibile combinare biotecnologia e sostenibilità, sviluppando approcci terapeutici basati su DNA sintetico e nuove tecniche di veicolamento. Sebbene siano necessari ulteriori studi per verificare la stabilità e l'efficacia del trattamento nel lungo periodo, queste ricerche rappresentano un passo significativo verso la realizzazione di terapie mirate e riproducibili, che potranno un giorno essere applicate non solo alla Glicogenosi di tipo III, ma anche ad altre malattie rare e non con le stesse caratteristiche.

per info: doriana.triggiani@enea.it

Riferimenti bibliografici

1. Franconi R, Giuliano G, Marino C, Demurtas OC, Triggiani D. (2020). Composto per il trattamento di una glicogenosi. EP 21712896.6, PCT/IB2021/05132, WO 2021/165841 A1. Rif. ENEA 889.
2. Triggiani D, Demurtas OC, Illiano E, Massa S, Pasquo A, Dionisi-Vici C, Marino C, Giuliano G, Franconi R. (2024) A functional human Glycogen Debranching Enzyme encoded by a synthetic gene: implications for Glycogen Storage Disease type III management. Protein & Peptide Letters (PPL) 2024 Jul 15. doi: 10.2174/0109298665307430240628063339.
3. Triggiani D, Pasquali E, Salati S, Cadossi R, Merla C, Franconi R. Electrogene Transfer for Glycogen Storage Disease Type III (GSDIII): A Non-Viral Approach to Overcome Glycogen Debranching Enzyme Deficiency. Submitted (2025) to Molecular Therapy Nucleic Acids (MTNA).

¹ PoC 2018 "Nuove Strategie Terapeutiche per la Glicogenosi di tipo 3 - STEG3"

² PoC 2022 "Ottimizzazione dell'efficacia di trasfezione per il trattamento locale di malattie muscolari rare e non (OTTIMUS)"

³ BIOGENERA - Sostenibilità e Innovazione per la Salute: Terapia Genica Non Virale per le Malattie Rare