

## Il Codice Deontologico dei Biotecnologi: parere sulla tecnologia CRISPR

10 Aprile 2018

### Le novità della Scienza

Le tecnologie di modificazione diretta del genoma (in inglese “*genome editing*”) sono a disposizione dei laboratori di biologia molecolare da molti anni: fino a non molto tempo fa, tuttavia, i metodi disponibili consentivano soprattutto di modificare batteri e lieviti (che hanno genomi molto piccoli), oppure topi su cui tanto è stato fatto per modificare il genoma degli embrioni per poter simulare e studiare malattie umane.

Per modificare il genoma in modo mirato solitamente si sfruttano gli strumenti che le cellule di tutti gli organismi hanno già a disposizione: provocando un piccolo taglio nel doppio filamento di DNA, nel punto desiderato, si stimolano i meccanismi di riparazione naturali del genoma. Con vari metodi è possibile “ingannare” questi meccanismi di riparazione in modo da introdurre un nuovo frammento di DNA (per esempio un gene desiderato) in corrispondenza del taglio, oppure cambiare una o più basi di DNA introducendo così una mutazione.

Le prime tecnologie di genome editing (*Zinc Finger*, TALEn) utilizzavano esclusivamente enzimi in grado di legarsi al DNA e riconoscere alcune delle sue parti senza grande specificità a fronte di uno sforzo elevato di ingegnerizzazione del complesso proteico: gli scienziati quindi dovevano utilizzare altri metodi (ad esempio resistenza ad alcuni farmaci) per identificare le cellule che avevano ricevuto la mutazione desiderata, lasciando così nel genoma delle tracce dovute a queste sequenze aggiuntive.

A partire dalla fine del 2012<sup>1</sup> è stata introdotta una nuova tecnologia, che deriva dall'ingegnerizzazione di un sistema conservato in moltissimi batteri e quasi tutti gli archeobatteri, chiamato CRISPR (da *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). CRISPR funziona come una sorta di meccanismo immunitario adattativo contro virus e plasmidi: le proteine Cas (da *CRISPR associated*) codificate all'interno della sequenza CRISPR vengono guidate da due frammenti di RNA per tagliare una sequenza bersaglio molto precisa, grazie alla capacità del DNA o dell'RNA di riconoscere in modo del tutto complementare altre sequenze di DNA. Gli scienziati possono così combinare questi enzimi con sequenze artificiali di RNA che guidano il macchinario di taglio esattamente nel punto da modificare, aumentando così in modo incredibile la precisione dell'intervento. Questo sistema è inoltre estremamente flessibile perché consente di combinare sia enzimi diversi (il sistema più usato e su cui si è concentrata la maggior parte degli studi è chiamato CRISPR/Cas9 perché utilizza la proteina Cas9) che sequenze guida differenti, consentendo di effettuare sul genoma modificazioni anche molto complesse senza lasciare nel DNA bersaglio alcuna “cicatrice”, come avviene nelle altre tecnologie.

Dopo diversi studi, alcuni anche su cellule umane e in vivo su topi, molto contestati (e perfino ritirati<sup>2</sup>), gli scienziati hanno inoltre suggerito che le modificazioni indotte casualmente in altre parti

---

<sup>1</sup> “A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity”, Jinek M. et al, *Science*, 2012: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22745249>

<sup>2</sup> <https://www.nature.com/articles/nmeth.4664>

del DNA, chiamate *off target*, (uno dei maggiori limiti nella modificazione mirata del genoma di un organismo) sono molto limitate.

In Aprile del 2015 un gruppo di scienziati in Cina ha applicato la tecnologia CRISPR per la prima volta ad embrioni umani triprounucleari (non destinati all'impianto)<sup>3</sup>, dimostrandone la possibilità di utilizzo per correggere una mutazione che causa la beta-talassemia (anche se con bassissima efficienza). Ad oggi l'utilizzo su cellule germinali umane è ancora oggetto di notevoli cautele. Ad agosto 2017, la rivista Nature ha pubblicato un articolo di un gruppo di ricerca a guida statunitense<sup>4</sup>, sovvenzionato da fondi privati, che ha modificato il patrimonio genetico di spermatozoi di un uomo affetto da cardiomiopatia ipertrofica, utilizzando poi gli stessi spermatozoi per fecondare ovociti sani e generare embrioni di cui studiare il DNA, allo scopo di comprendere se e come correggere una mutazione genetica patologica in embrioni. L'esperimento ha consentito di acquisire numerose informazioni sulla risposta delle cellule germinali al *genome-editing*, aprendo potenzialmente le porte a numerosi altri studi.

Nell'ottobre 2016 si è invece partiti con la prima sperimentazione clinica sull'uomo, con un trial cinese<sup>5</sup>. Da quel primo esempio, nel database dei trial clinici dell'NIH ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)) ora risultano attive otto sperimentazioni cliniche che coinvolgono l'utilizzo della tecnologia CRISPR/Cas9, di cui 7 avviate in Cina a partire da agosto 2016 mentre l'ottava è stata registrata a febbraio 2018 da un gruppo di ricercatori dell'università della Pennsylvania e di cui dovrebbe essere già in fase avanzata il reclutamento dei pazienti (la prima sperimentazione europea è prevista debba iniziare entro la fine dell'anno in corso). Gli studi clinici attivi, tutti di fase I o I/II, sono incentrati sullo sviluppo di terapie antitumorali mediate da cellule del sistema immunitario modificate tramite CRISPR in modo da attivare la risposta immunitaria all'insorgenza di un tumore (oncoimmunoterapia) e ad oggi sembrano non essere stati riscontrati problemi di sicurezza della terapia somministrata.

Altra grande area in cui il *genome editing* sta cambiando il corso della ricerca è quella degli *xenotrapianti*, cioè dei trapianti di organi provenienti da altre specie animali: con la scarsa disponibilità di organi umani per il trapianto, c'è sempre stato un grande interesse a colmare questo limite usando organi provenienti soprattutto dal maiale, sia per l'abbondanza del materiale sia per la similarità anatomica. Tuttavia, oltre ai problemi di rigetto dovuti al sistema immunitario, è ben conosciuto che nel maiale esistano retrovirus inattivi che sono diventati parte del genoma e si è sempre temuta la possibilità, anche se non confermata, che questi virus possano attivarsi una volta che l'organo sia stato trapiantato nell'uomo. Con le tecniche CRISPR/Cas, invece, alcuni ricercatori sono riusciti a "cancellare" questi retrovirus<sup>6</sup>, e si spera di poter rendere gli organi più tollerabili da parte del sistema immunitario umano ("umanizzati").

Anche in ambito agroalimentare l'interesse per le potenzialità offerte dal *genome editing* mediante CRISPR/Cas9 si è dimostrato fin da subito molto elevato. Tale settore, caratterizzato da normative molto stringenti per quanto riguarda sperimentazione, coltivazione ed eventuale commercializzazione di OGM, potrebbe infatti trarre notevoli benefici da un quadro normativo non altrettanto complesso. Questo è lo scenario che si va delineando negli Stati Uniti, dove il Dipartimento di Agricoltura nazionale (USDA) ha deciso di non regolamentare diverse specie modificate con CRISPR/Cas9: tra queste si annoverano ad esempio un fungo champignon che non si scurisce quando tagliato, un mais ad elevato contenuto di amilopectina e una specie vegetale che esprime maggiormente gli omega-3. Per quanto riguarda la situazione in Europa, il

<sup>3</sup> "CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triprounuclear zygotes", Liang et al., Protein and Cell, 2015

<sup>4</sup> "Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos", Ma et al., Nature, 2017

<sup>5</sup> <https://www.nature.com/news/chinese-scientists-to-pioneer-first-human-crispr-trial-1.20302>

<sup>6</sup> "Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs)", Yang L, et al, Science, 2015

quadro non è ancora altrettanto chiaro: si è infatti in attesa che la Corte di Giustizia UE esprima la sua posizione, al fine di chiarire se l'impiego di tecniche di *genome editing* sarà considerato, o meno, alla stregua degli organismi OGM.

È altresì innegabile che, a livello mondiale, il fermento della comunità scientifica sia notevole, come lo conferma il sempre crescente numero di articoli scientifici che presentano applicazioni di CRISPR/Cas9 in ambito agroalimentare.

Sempre di più, inoltre, questa tecnologia trova applicazioni su larga scala e anche su intere popolazioni: è infatti grazie a CRISPR/Cas9 che è diventato più fattibile il cosiddetto "*gene drive*", ovvero la possibilità di favorire la trasmissione (o meno) di un tratto desiderato, o di una variante genetica che lo determina, attraverso le generazioni. Questo fenomeno avviene in alcuni casi naturalmente durante l'evoluzione, ma l'applicazione di CRISPR offre la possibilità di creare *gene drive* sintetici, disegnando il processo in modo molto preciso. Interventi così costruiti hanno la possibilità di propagarsi all'intera popolazione target e per questo motivo sollevano non poche domande di carattere bioetico e sulla capacità di gestione (o contenimento) di una simile applicazione su larga scala. Uno degli esempi più utilizzati è forse il progetto di eradicare la trasmissione della malaria rendendo sterili le femmine delle zanzare portatrici.

La possibilità di intervenire sui caratteri ereditari e modificare intere popolazioni invita alla cautela e alla trasparenza: per questo ha sollevato un grande dibattito qualche anno fa l'iniziativa di un gruppo di scienziati, in un meeting a porte chiuse, ha proposto la possibilità di usare le tecnologie di *genome editing* per riscrivere artificialmente l'intero genoma umano, allo scopo di riuscire a comprenderlo meglio<sup>7</sup>. La filosofia di questo approccio è che ricostruire elemento per elemento il nostro genoma aiuterebbe meglio a capire come funziona, rispetto all'approccio puramente di lettura e studio fino ad ora seguito.

## Il dibattito in corso, tra etica e coinvolgimento della società

La discussione sull'utilizzo delle tecniche di *genome editing*, e in particolare la sua applicazione in ambito clinico umano, ha percorso di pari passo lo sviluppo e il raffinamento delle tecnologie, soprattutto a partire dalla pubblicazione del primo studio cinese che utilizzava la tecnologia CRISPR su zigoti umani, e pubblicato nell'aprile 2015 su "Protein Cell" (come precedentemente indicato), dopo essere stato rifiutato dalle riviste Nature e Science, per motivi etici. Nella comunità scientifica, molti esponenti delle biotecnologie applicate all'ambito umano della prima ora si sono inizialmente schierati a favore di una moratoria<sup>8</sup>, per poi invocare un consesso scientifico e bioetico per discuterne la possibilità, sulla falsariga di quello che fu messo in piedi nel febbraio del 1975 ad Asilomar, all'alba dell'introduzione delle tecnologie del DNA ricombinante. A dicembre 2015 si è così tenuto il primo "International Summit on Human Genome Editing", promosso congiuntamente dalle accademie scientifiche degli USA, UK e Cina. Il risultato non è stata però la tanto invocata moratoria, ma un invito a procedere con cautela e in maniera "responsabile", soprattutto nell'applicazione sull'uomo ed eventualmente anche su linee germinali da impianto (con finalità procreativa), e solo dopo aver avanzato con studi e dati a supporto, che al momento del summit erano pressoché inesistenti. Il consesso si è chiuso con un invito a continuare la discussione e a istituire un comitato di esperti allo scopo di redigere un documento sugli aspetti scientifici, etici e di governance del genome editing. Il gruppo internazionale di esperti ha quindi pubblicato a febbraio 2017 il report "Human Genome Editing: Science, Ethics, and Governance", tracciando una sorta di documento di linee guida, con un'apertura ancora maggiore ad eventuali usi futuri delle tecniche di genome editing in cellule germinali ed embrionali, allo scopo di ottenere

<sup>7</sup> <https://www.nytimes.com/2016/05/14/science/synthetic-human-genome.html>

<sup>8</sup> <http://science.sciencemag.org/content/348/6230/36.summary>

embrioni sani, in caso per esempio di genitori portatori di difetti genetici, per cui non esistano alternative terapeutiche.

I temi che normalmente occupano la discussione in questi summit o nelle più recenti conferenze internazionali con proposte di istituire un'associazione internazionale sul *genome editing*<sup>9</sup>, nonostante i buoni propositi di allargare la platea di discussione ad attori non solo provenienti dall'ambito scientifico o di *expertise* bioetico, generalmente si concentrano sulla valutazione del tipo rischi/benefici o circa la liceità, dal punto di vista legale, di poter procedere o meno ad un'applicazione specifica di queste tecnologie. Manca del tutto una messa in discussione delle leggi e delle regole vigenti (più stringenti o più permissive), in virtù di una rinnovata e allargata discussione etica e sociale, come molti esperti del rapporto scienza e società evidenziano da tempo, reclamando nuovi solidi meccanismi di consultazione e deliberazione a livello internazionale<sup>10</sup>, che possano aprire la porta a diverse voci e istanze della società e che possano spostare la discussione dal "cosa la tecnologia può fare e quindi come regolarla" al come la società voglia disegnare il suo futuro attraverso questa tecnologia e in che grado, ammesso che voglia accoglierla<sup>11</sup>.

Al momento, ci sono stati pochissimi casi di consultazione pubblica sul tema *genome editing*. Il primo e unico esempio europeo è quello condotto dal team di ricercatori del progetto europeo NERRI (Neuro-Enhancement: Responsible Research and Innovation), in cui un questionario è stato somministrato in 10 paesi, tra cui l'Italia, andando a indagare quale sia l'opinione pubblica circa l'applicazione delle tecnologie sia per scopo terapeutico sia per scopo di enhancement su adulti e bambini<sup>12</sup>.

## La posizione del Codice Deontologico

Il numero di patologie genetiche note cresce ogni giorno, in maniera direttamente proporzionale alle conoscenze acquisite dai ricercatori. Più cose scopriamo sul nostro genoma, più siamo in grado di conoscere le basi genetiche delle malattie. Negli ultimi decenni l'acquisizione di queste informazioni ci ha consentito di fare enormi passi avanti nella comprensione dei meccanismi molecolari alla base di molte malattie, consentendoci di arrivare in alcuni casi anche alla sperimentazione clinica, come nel caso della SMA (Spinal Muscular Atrophy).

**Alla luce del Codice Deontologico dei Biotecnologi, non si può pertanto che accogliere con favore ed entusiasmo il crescente uso delle biotecnologie in ogni settore**, e la scoperta di nuovi strumenti che ne garantiscano una maggiore efficacia e sicurezza.

Il sistema CRISPR, grazie alla sua facilità di applicazione, si sta dimostrando una tecnologia rivoluzionaria, con incredibili potenzialità cliniche.

Gli articoli 11 e 13 del Codice Deontologico dei Biotecnologi consentono l'utilizzo di embrioni non destinati all'impianto (cosiddetti "abbandonati" o "sovranumerari") che quindi possono essere utilizzati dai Biotecnologi allo scopo di migliorare l'efficienza e la specificità del sistema di *genome editing*. Allo stesso tempo, l'articolo 13 del Codice Deontologico consente l'uso di questa tecnologia sugli embrioni destinati all'impianto, e pertanto anche l'applicazione in ambito clinico sulla linea germinale umana.

Nonostante i recenti progressi per garantire al minimo l'introduzione di mutazioni indesiderate, questa tecnologia non sembra tuttavia ancora pronta per applicazioni cliniche in cui si intervenga direttamente sulla linea germinale: per questi motivi **la nostra Deontologia concorda con i**

---

<sup>9</sup> <http://arrige.org/>

<sup>10</sup> <https://www.nature.com/articles/d41586-018-03269-3>

<sup>11</sup> <https://www.nature.com/articles/d41586-018-03270-w>

<sup>12</sup> "Public views on gene editing and its uses", Gaskell et al., Nature Biotechnology, 2017

**maggiori esperti del settore che richiamano alla cautela sull'uso del *genome-editing* sulla linea germinale per motivi tecnici, e ne incoraggia allo stesso tempo la ricerca, anche utilizzando embrioni sovranumerari, proprio per raggiungere in un futuro sufficienti livelli di efficienza e sicurezza che ne consentano una applicazione clinica. Secondo la Deontologia, dovremmo accogliere con favore il crescente numero di applicazioni di questa tecnologia in ambito clinico che prevedano invece la modificazione di cellule somatiche o cellule staminali, richiamando la necessità del rispetto delle norme di sicurezza per lo sviluppo di prodotti terapeutici e la garanzia dei pazienti coinvolti, come previsto dagli artt. 15 e 18 del Codice Deontologico.**

Non si può non vedere come una grande promessa, utile a risolvere l'annoso problema della carenza di organi per i trapianti, anche il nuovo e crescente interesse per l'applicazione del *genome editing* anche agli xenotrapianti. **La Deontologia dei Biotecnologi è in linea con l'auspicio che vengano presto fatti ulteriori passi nel garantire la sicurezza degli organi utilizzati, per dare così nuova speranza ai tanti pazienti oggi in attesa di un donatore.**

Per quanto riguarda l'ultima proposta di Boeke e colleghi sull'uso del *genome editing* per ricostruire un genoma umano sintetico, riteniamo che la comunità scientifica sia agli albori di una nuova fase, e che sia difficile esprimere una valutazione scientifica sulla proposta, del tutto preliminare. ANBI è però da sempre impegnata nel rapporto tra scienza e società, e sicuramente ha colpito che la prima conferenza sul tema sia stata realizzata a porte chiuse, praticamente in segreto. **La nostra Deontologia invita pertanto a realizzare ogni innovazione non soltanto in modo responsabile, ma anche e soprattutto in modo partecipato**, coinvolgendo non soltanto gli esperti scientifici o di impatti etici, ma anche i numerosi attori della società civile che sono sempre i destinatari degli avanzamenti della Scienza e dei benefici che essi portano.

## **Per gli addetti ai lavori: la letteratura scientifica**

*Una bella review sul sistema CRISPR-Cas da Nature Biotechnology che spiega tutte le possibili applicazioni della tecnologia, e i meccanismi molecolari di funzionamento.*

CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes

Jeffrey D Sander & J Keith Joung

Nature Biotechnology 2014 doi:10.1038/nbt.2842

*Uno studio che misura il carico di mutazioni casuali su tutto il genoma, provocato dall'uso di tecniche di editing*

Targeted Gene Correction Minimally Impacts Whole-Genome Mutational Load in Human-Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cell Clones

Keiichiro Suzuki et al.

Cell Stem Cell 2014 <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2014.06.016>

*Questa è la pubblicazione che ha suscitato molto dibattito, sull'uso della tecnologia in embrioni umani.*

CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes

Puping Liang et al.

Protein Cell 2015, 6(5):363–372 DOI 10.1007/s13238-015-0153-5

*In questa pubblicazione si discutono le modifiche alla proteina Cas9 derivata da uno Streptococco, per migliorare la specificità e ridurre le mutazioni cosiddette off-target*

Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity

Ian M. Slaymaker et al.

Science 01 Jan 2016: Vol. 351, Issue 6268, pp. 84-88 DOI: 10.1126/science.aad5227

*In questo articolo, si presenta una visione di insieme e una prospettiva sul ritorno in voga degli xenotrapianti, grazie all'uso del genome-editing*

Xenotransplantation makes a comeback

Jeffrey M Perkel

Nature Biotechnology 34, 3–4 (2016) doi:10.1038/nbt0116-3

*In questo articolo gli scienziati che hanno organizzato la conferenza segreta sul genoma sintetico presentano la loro proposta*

The Genome Project–Write

Jef D. Boeke et al.

Science 02 Jun 2016: DOI: 10.1126/science.aaf6850

Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos

Nature volume 548, pages 413–419 (24 August 2017)

doi:10.1038/nature23305

*In questo articolo si offre una completa panoramica dei meccanismi di “gene drive”, sia osservati in popolazioni normali che mediati dalle nuove tecnologie*

Cheating evolution: engineering gene drives to manipulate the fate of wild populations

Nature Reviews Genetics volume 17, pages 146–159 (2016)

doi:10.1038/nrg.2015.34

--

### **Parere 02/2018 del 10 Aprile 2018**

*Il presente Parere ha funzione interpretativa del Codice Deontologico dei Biotecnologi, relativamente al contesto della tecnologia CRISPR ed è rilasciato dal Collegio dei Probiviri ANBI ai sensi dell'art.28 c.4 del Codice.*