



Fondazione per la Ricerca
sulla Fibrosi Cistica - ETS
fibrosicisticaricerca.it

AREA 1

Terapie e approcci innovativi per
correggere il difetto di base, genetica



Progetto GMSG#1/2022

Sviluppo di sistemi di trasporto per la tecnologia
CRISPR-Cas per la cura della fibrosi cistica



Chi ha condotto la ricerca:

Responsabile: **Giulia Maule** (Dipartimento di Biologia Cellulare, Computazionale e Integrata - CIBIO, Università di Trento)



Ricercatori coinvolti: 4



Qual è la durata dello studio: 3 anni



Finanziamento: € 149.000



Adottato da:

Delegazione FFC Ricerca Val d'Alpone,
Together for Life





Perché è importante

Il progresso delle tecnologie per l'*editing* genomico, come CRISPR-Cas, ha consentito di correggere le mutazioni nel gene CFTR, con ottimi risultati in modelli sperimentali derivati da persone con fibrosi cistica (FC). La sfida principale resta però il trasporto nei polmoni.

Un metodo promettente è l'uso di vescicole ingegnerizzate, cioè piccole "navicelle" che possono essere indirizzate verso specifici tessuti.

Questo sistema permette al materiale trasportato di agire solo per un tempo limitato nelle cellule, correggendo il gene CFTR senza causare cambiamenti indesiderati nel DNA.



Che cosa hanno usato i ricercatori

Sono state usate particolari nanoparticelle derivate da virus, chiamate VESiCas, da cui sono state generate nuove vescicole dette GE-*vesicles*.

La loro efficienza di trasporto è stata testata su cellule epiteliali standard usate in laboratorio, su cellule epiteliali bronchiali umane e su modelli animali di topo.



Che cosa hanno fatto i ricercatori

Le GE-*vesicles* sono state caricate con diversi strumenti CRISPR: nucleasi, che effettuano tagli mirati nel DNA, o *base editor*, capaci di modificare le basi del DNA. Sono state testate diverse composizioni del loro involucro, diverse dimensioni e quantità; infine, è stata valutata la loro affinità con il tessuto polmonare.

Una volta ottimizzate le GE-*vesicles*, i ricercatori hanno verificato la loro efficienza *in vitro* per correggere le mutazioni R553X (una mutazione stop) o 3849+10kbC>T (una mutazione di splicing).

Le vescicole sono state ulteriormente modificate per aumentare la capacità di entrare nelle cellule polmonari.



Che cosa hanno ottenuto

I ricercatori hanno osservato che il trasporto di sistemi per l'*editing* genomico tramite vescicole è molto efficiente nei modelli cellulari usati, e che i diversi strumenti CRISPR al loro interno sono in grado di correggere efficacemente mutazioni come R553X e 3849+10kbC>T. È stato inoltre identificato l'involucro virale più efficace per permettere alle vescicole di penetrare nelle cellule delle vie respiratorie umane.



Che cosa succederà ora

I risultati ottenuti dimostrano che le vescicole sono una tecnica promettente per trasportare CRISPR nei polmoni. I ricercatori si occuperanno di valutare l'efficacia delle vescicole *in vitro* in cellule epiteliali bronchiali derivate da persone con FC; inoltre testeranno l'efficacia di GE-*vesicles* contenenti diversi strumenti CRISPR in un modello animale di topo, selezionando l'involucro più adatto.

Per saperne di più



Obiettivi

Analisi di nuove nucleasi Cas per il *gene editing* in fibrosi cistica e studio di un sistema di trasporto e distribuzione dell'apparato CRISPR-Cas nell'organismo per raggiungere efficacemente il polmone

La tecnologia di *editing* genomico CRISPR-Cas è in grado di correggere in modo efficiente e preciso alcune delle mutazioni che causano la fibrosi cistica (FC). Sebbene queste strategie si siano rivelate molto efficaci in modelli cellulari derivati da persone con FC, l'ostacolo principale rimane il *delivery in vivo* del sistema CRISPR-Cas, ovvero la sua distribuzione all'interno dell'organismo, in particolar modo ai polmoni.

In questo progetto i ricercatori si propongono di sviluppare un sistema efficiente di distribuzione del sistema di *editing* genomico all'epitelio polmonare, sfruttando particolari nanoparticelle derivate da virus chiamate VESiCas.

Queste nanoparticelle si sono già dimostrate efficaci come sistema di trasporto e hanno il vantaggio di modulare l'attivazione del sistema CRISPR. Infatti, a differenza della terapia genica convenzionale, nell'*editing* genomico la nucleasi, enzima specializzato nel taglio del DNA e necessario per riparare le mutazioni, deve essere attivata solo il tempo necessario per apportare la modifica alla porzione bersaglio.

Infine, il progetto analizzerà l'azione di nuove e più efficienti nucleasi, come la Cas12a.

I sistemi basati su VESiCas verranno testati in cellule polmonari primarie e, successivamente, valutati *in vivo* in modelli animali.

Il sistema VESiCas potrebbe essere impiegato anche per altre malattie polmonari ed essere adattato per agire specificatamente su altri tessuti, ampliando così il suo uso alla cura di altre malattie genetiche.



Risultati

Le GE-vescicles trasportano efficientemente il sistema CRISPR in modelli cellulari, permettendo la correzione di alcune mutazioni di CFTR

Il progresso delle tecnologie per l'*editing* genomico, come CRISPR-Cas, ha consentito di correggere le mutazioni nel gene CFTR, con ottimi risultati in modelli sperimentali derivati da persone con fibrosi cistica (FC). La sfida principale resta però il trasporto nei polmoni.

Un metodo promettente è l'uso di vescicole ingegnerizzate, cioè piccole "navicelle" che possono essere indirizzate verso specifici tessuti.

Questo sistema permette al materiale trasportato di agire solo per un tempo limitato nelle cellule, correggendo il gene CFTR senza causare cambiamenti indesiderati nel DNA.

In questo progetto sono state usate particolari nanoparticelle derivate da virus, chiamate VESiCas, da cui sono state generate nuove vescicole dette GE-vescicles.

Le nuove vescicole sono state caricate con diversi strumenti CRISPR: nucleasi, che effettuano tagli mirati nel DNA, o *base editor*, capaci di modificare le basi del DNA.

Sono inoltre state testate diverse composizioni del loro involucro, diverse dimensioni e quantità; infine, è stata valutata la loro affinità con il tessuto polmonare.

Una volta ottimizzate le GE-vescicles, i ricercatori hanno verificato la loro efficienza su cellule epiteliali standard usate in laboratorio e su cellule epiteliali bronchiali umane per correggere le mutazioni R553X (una mutazione stop) o 3849+10kbC>T (una mutazione di splicing).



Le vescicole sono state ulteriormente modificate per aumentare la capacità di entrare nelle cellule polmonari.

I ricercatori hanno osservato che il trasporto di sistemi per l'*editing* genomico tramite vescicole è molto efficiente nei modelli cellulari usati, e che i diversi strumenti CRISPR al loro interno sono in grado di correggere efficacemente mutazioni come R553X e 3849+10kbC>T. È stato inoltre identificato l'involucro virale più efficace per permettere alle vescicole di penetrare nelle cellule delle vie respiratorie umane.

I risultati ottenuti dimostrano che le vescicole sono una tecnica promettente per trasportare CRISPR nei polmoni.

I ricercatori si occuperanno di valutare l'efficacia delle vescicole *in vitro* in cellule epiteliali bronchiali derivate da persone con FC; inoltre testeranno l'efficacia di GE-*vesicles* contenenti diversi strumenti CRISPR in un modello animale di topo, selezionando l'involucro più adatto.

Rendiconto economico



AREA 1

Terapie e approcci innovativi per correggere il difetto di base, genetica

Progetto GMSG#1/2022

Sviluppo di sistemi di trasporto per la tecnologia CRISPR-Cas per la cura della fibrosi cistica



Responsabile:
Giulia Maule

(Dipartimento di Biologia Cellulare, Computazionale e Integrata - CIBIO, Università di Trento)



Periodo:

01/09/2022 - 31/08/2025



Grant assegnato:

€ 149.000,00



Usato per:

- Materiale di consumo € 73.598,15
- Spese viaggio/convegni € 3.688,93
- Borse di studio € 56.850,00
- Servizi scientifici € 9.457,80

€ 143.594,88



Saldo (usato per altri progetti):

€ 5.405,12