

# Brevettabilità nel Settore Biotech

## CRISPR

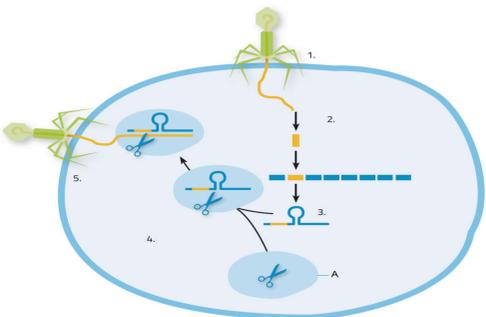
il sistema DNA-editing di origine batterica

### Panoramica dei brevetti europei concessi a seguito della sua ingegnerizzazione

L. Leo, C. Germinario\*, P. Di Giovine\*, F. Bigucci, G.M. Rossi, S. Bertoli, G. D'orazio, M. Cini, P. Rampinelli  
Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie, FaBiT, Università di Bologna - \*Società Italiana Brevetti



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



Chan H. 2016. *Science in School* 38:18-21

## CRISPR

**Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats**  
Brevi ripetizioni palindrome raggruppate e separate a intervalli regolari

**Cos'è ?** è un locus genico batterico, in cui risiede l'informazione della immunità batterica acquisita nei confronti di virus batteriofagi (virus dei batteri).

**Componenti:** il locus CRISPR è formato da una sequenza di DNA in cui dei frammenti identici ripetuti (*repeats*) sono intervallati da frammenti di DNA fagico (*spacers*).

**Come si acquisiscono gli spacers ?** A seguito di infezioni virali alle quali il batterio riesce a sopravvivere frammentando il DNA virale. Possono essere acquisiti anche per trasmissione verticale dai progenitori oppure, meno frequentemente, per trasmissione orizzontale tramite vettori plasmidici.

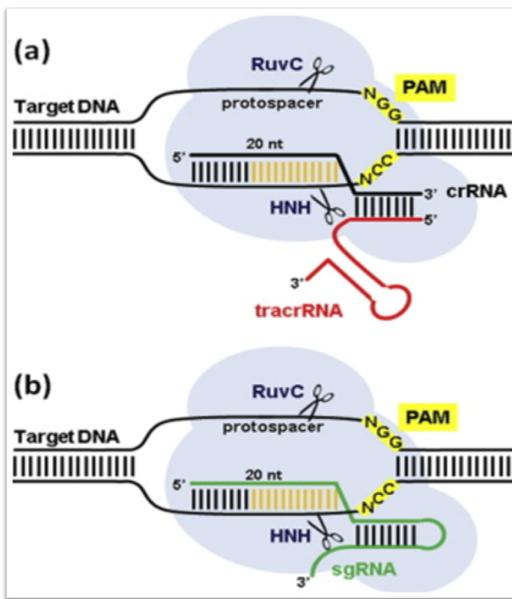
**Come funziona:** Il locus di DNA è trascritto e processato in un filamento di *guide RNA* lungo 20 nucleotidi (*crRNA*), al quale, nel sistema più studiato, cioè il complesso **CRISPR di tipo II** (riscontrato nel batterio *Streptococcus pyogenes*), si associa un secondo filamento di RNA complementare (*tracrRNA*) in grado di ibridarsi, oltre che con il *crRNA*, anche su se stesso, formando delle *hairpins*.

Il *tracrRNA* è essenziale per il reclutamento e l'attivazione della proteina ad attività nucleasica **Cas** (Crispr associated system), che con il doppio filamento di RNA costituisce il complesso **CRISPR-Cas**.

Il *guide RNA* riconosce la sequenza trinucleotidica (NGG) detta **PAM (Protospacer Adjacent Motif)** localizzata sul DNA virale - in posizione adiacente, ma sul filamento opposto, rispetto alla sequenza del DNA target - complementare ai 20 nucleotidi del *crRNA*. Il *crRNA* e il DNA target si ibridano tra loro. Il doppio filamento di DNA interagisce con il Cas, in cui sono presenti due siti ad attività nucleasica che tagliano e digeriscono i due frammenti opposti.

**Effetti:** il risultato è un **double strand break**, cioè una rottura altamente specifica del doppio filamento di DNA fagico target.

**Vantaggio per il batterio:** tagliando il DNA fagico, il virus viene neutralizzato ed il batterio sopravvive all'attacco virale.



Bortesi L, Fischer R. 2015. *Biotechnol Adv*. 33: 41-52

BREVETTI SUL SISTEMA CRISPR CAS RILASCIATI IN EUROPA  
2012 / 04. 2019

TIPOLOGIA DI INVENZIONI	BREVETTI RILASCIATI	
COMPONENTI del CRISPR-Cas9	CRISPR RNA	1
	gRNA	3
	ENZIMA Cas9	2
	ALTRE NUCLEASI	2
ATTIVITA' del CRISPR-Cas	IDENTIFICARE/ SELEZIONARE ATTIVITA' del COMPLESSO	2
	PROMUOVERE ATTIVITA'	3
	CONFERIRE ALTRE ATTIVITA'	2
VETTORI	CASSETTE DI ESPRESSIONE	5
DELIVERY		2
APPLICAZIONI	GENE EDITING	16
	THERAPY	2
	REGOLAZIONE	1
	TARGETING	2
	CEPPI BATTERICI: CARATTERIZZAZIONE/ MODULAZIONE DELLA RESISTENZA	8
	APPLICAZIONE A CEPPI VIRALI	1
INVENZIONI REALIZZABILI UTILIZZANDO VARIE TECNOLOGIE TRACUI CRISPR	APPLICATE AD ANIMALI	1
	APPLICATE A PIANTE	5
	SCOPO TERAPEUTICO	5

Tabella creata dagli autori. 2019©

DOMANDE DI BREVETTO DEPOSITATE IN EUROPA PER APPLICAZIONI TERAPEUTICHE DEL SISTEMA CRISPR CAS

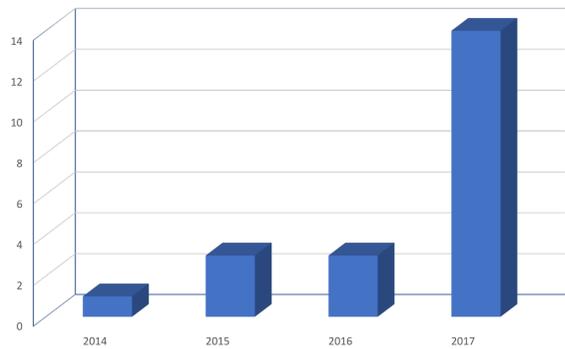


Grafico creato dagli autori. 2019©

Il maggior numero di domande di brevetto depositate è riferibile al Broad Institute (MIT & Harvard)

## IL POTENZIALE TERAPEUTICO

NON SI HANNO ANCORA EVIDENZE CLINICHE RILEVANTI SULLE POSSIBILITÀ DI APPLICAZIONE TERAPEUTICA DEL SISTEMA CRISPR-CAS

## OSTACOLI

Al momento permangono ancora molti ostacoli da superare per lo sviluppo di un sistema CRISPR con pieno potenziale terapeutico. Emerge la necessità di limitare le mutazioni *off-target*, *indesiderate*. Queste ultime sono mutazioni che si verificano, per motivi ancora sconosciuti, in modo apparentemente casuale, quando il sistema va ad esplicare la propria azione su una sequenza diversa da quella target.

## SOLUZIONI PROPOSTE

1. Perfezionare l'omologia della sequenza *crRNA* con la sequenza target per ottenere una maggiore specificità del sistema ovvero per direzionare correttamente il Cas. Per fare ciò, le sequenze adiacenti alla sequenza target dovranno essere più specifiche possibile, al fine di ridurre eventuali azioni del Cas su altri punti del genoma.
2. Inoculazione nelle cellule di proteine Cas già in forma di complesso Ribonucleoproteico (RNP).
3. Utilizzo di un gene Cas inducibile, che sia espresso solo in determinate condizioni.
4. Utilizzo, per tagliare il target, di due complessi di *guide RNA* (anziché uno) direzionanti due distinti Cas, ognuno dei quali presenta una sola nucleasi (invece di due). Ciascuna nucleasi taglia uno solo dei due filamenti, diminuendo il numero di errori. Infatti se la ipotetica rottura *off-target* è singola, questa può essere efficientemente riparata in modo preciso.

**European Patent Office**

### Rule 27 EPC

#### Patentable biotechnological inventions

Biotechnological inventions shall also be patentable if they concern:

*(a) biological material which is isolated from its natural environment or produced by means of a technical process even if it previously occurred in nature; ...omissis ...*

## CRISPR/Cas come tecnica di DNA-editing

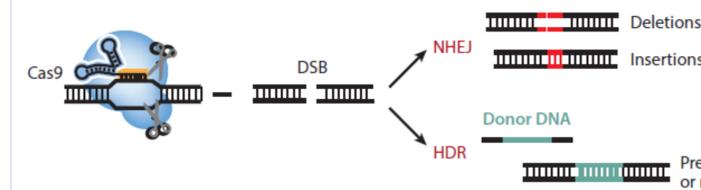
**Semplicità di Ingegnerizzazione:** il sistema è stato ingegnerizzato mediante la fusione dei due segmenti di RNA ai quali la proteina Cas si lega. I due segmenti: *crRNA* e *tracrRNA*, si fondono ad opera di alcuni nucleotidi, generando un *single guide RNA*.

È sufficiente costruire la sequenza di 20 nucleotidi del frammento di *crRNA* per indirizzare il complesso CRISPR-Cas al target complementare. Successivamente si possono operare degli ulteriori interventi di ingegnerizzazione, quali:

- a) associazione al complesso enzimatico Cas di un frammento polinucleotidico, che la cellula possa utilizzare come *template* durante la riparazione del taglio indotto dalla stessa proteina Cas;
- b) associazione alla proteina Cas di specifici domini effettori, per esplicare sul DNA target le proprie funzioni;
- c) silenziamento dell'attività nucleasica della proteina Cas: ne deriva un Cas ancora in grado di contrarre il legame con il target, ma incapace di tagliarlo.

**Come si ripara il taglio?** La risposta cellulare al danno è un meccanismo endogeno che opera sia nei procarioti che negli eucarioti, e può avvenire:

1. per mezzo di un evento di ricombinazione non-omologa (casuale) derivandone una mutazione che quasi sempre comporta il silenziamento del gene interessato;
2. attraverso la ricombinazione omologa, la quale è naturalmente predisposta per riparare le rotture del doppio filamento localizzate a livello delle forcelle di replicazione - fornendo un frammento polinucleotidico che funga da stampo (*template*) - e inserendolo tra le estremità risultanti dal taglio, mentre le polimerasi lo utilizzano come stampo per riparare il filamento opposto.



Xiong X, Chen M, Lim WA, Zhao D, Qi LS. 2016. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 17:131-54

## APPLICABILITÀ DEL SISTEMA CRISPR-CAS

Il sistema ottenuto è utilizzato in ingegneria genetica ed è applicabile:

- A - per produrre vegetali con determinate caratteristiche di resistenza
- B - come metodo di trattamento terapeutico negli eucarioti

Il sistema CRISPR-Cas può essere utilizzato per la correzione delle mutazioni che causano alcune malattie geniche (per es. nella Duchenne Muscular Dystrophy o nell'emofilia).

Il complesso si può ingegnerizzare per operare l'inattivazione di oncogeni attivi, così come per promuovere l'attivazione di geni oncosoppressori. Ciò è possibile grazie all'utilizzo del Cas - privato dell'attività nucleasica - come vettore per veicolare un dominio effettore specifico ad una specifica sequenza genomica.

Possibili livelli di codifica e/o espressione del complesso CRISPR-Cas

DNA Codificante per il complesso

RNA Guide RNA + mRNA codificante per Cas - INSTABILE -

COMPLESSO RIBONUCLEOPROTEICO (RNP) Guide RNA + Proteina Cas

**Bibliografia:**  
Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315:1709-12  
Bikard D, Jiang W, Samai P, Hochschild A, Zhang F, Marraffini LA. 2013. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res*. 41:7429-37  
Jiang F, Doudna J. 2017. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. *Annu Rev Biophys*. 46:505-29  
Min YL, Bassel-Duby R, Olson EN. 2019. CRISPR Correction of Duchenne Muscular Dystrophy. *Annu Rev Med*. 70:239-55  
Wen WS, Yuan ZM, Ma SJ, Xu J, Yuan DT. 2016. CRISPR-Cas9 systems: versatile cancer modelling platforms and promising therapeutic strategies. *Int J Cancer* 138:1328-36  
**Banche Dati:**  
Espacenet - European Patent Office <https://worldwide.espacenet.com/>  
Orbit <https://www.orbit.com>