

Armi biologiche e biotecnologie

2[^] parte

Silvana de Candia
Biologa
Biotecnologa industriale
Master in Virologia molecolare
Master in Nutrizione Clinica

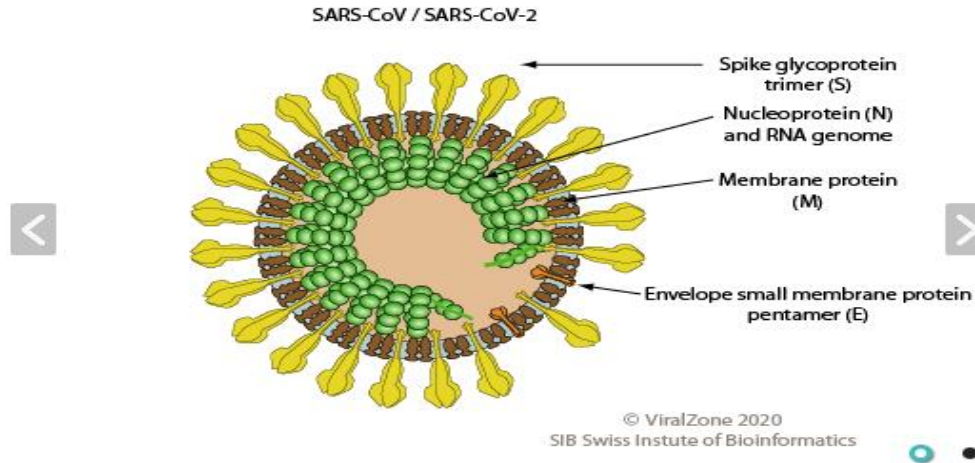


COVID - 19

SARS-CoV-2, COVID-19 Coronavirus Resource

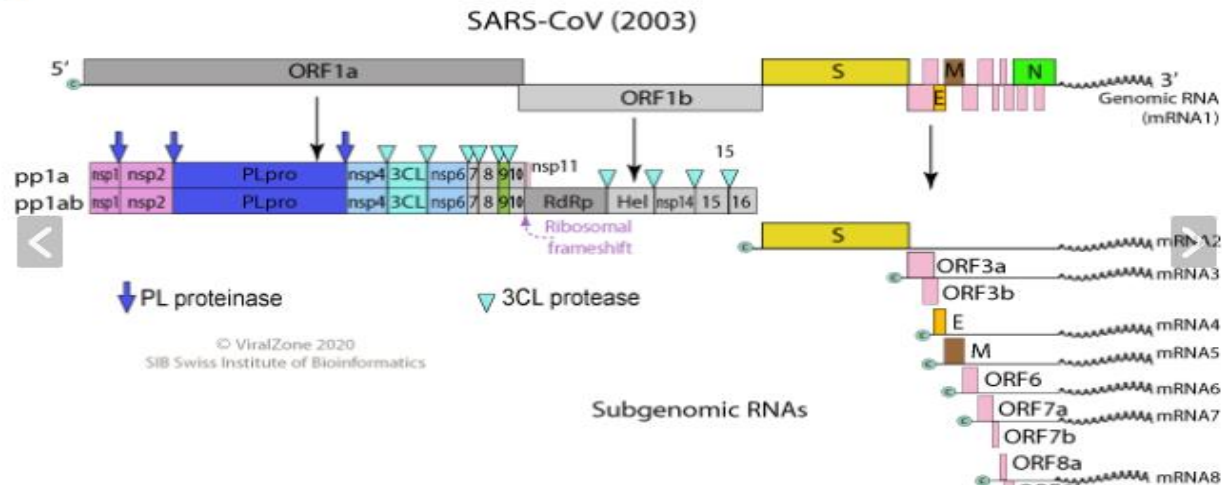


VIRION



Enveloped, spherical, about 120 nm in diameter. The RNA genome is associated with the N protein to form the nucleocapsid. see [Neuman BW et al.](#) for virion cryo-electron microscopy analysis.

GENOME



COVID - 19

Patogenicità e virulenza	Trasmissione per via aerea	Contagiosità	Immunizzazione difficile	Trattamento difficile	Rivelamento ed identificazione difficili
X	X	X	X (assenza iniziale di vaccino)	X	X (in fase iniziale della pandemia)


COVID - 19

Variant of concern (VOC): A variant for which there is evidence of an increase in transmissibility, more severe disease and or escape of neutralization by antibodies

Lineage	Synonyms	Emergence	Spike variants	Other variants	Consensus sequences	Phenotypes
Alpha >PANGO >BV-BRC	B.1.1.7, 20I/501Y.V1, VOC 202012/01	UK, Sep 2020	Del 69-70 Del 144 N501Y A570D D614G P681H T716I S982A D1118H	ORF1ab: T1001I ORF1ab: A1708D ORF1ab: I2230T, del:11288:9, del:21765:6, del:21991:3 ORF8: R52I ORF8: Q27* ORF8: Y73C N: D3L N: S235F	Genome Spike protein UniProt Spike protein NCBI	Increased transmissibility: 29% . Potential increase in risk of hospitalization (40-64%) and risk of death (30-70%). No adverse effects on vaccine efficacy
Beta >PANGO >BV-BRC	B.1.351, 20H/501Y.V2	South Africa, Aug 2020	(L18F) D80A D215G (Del 241-243) K417N E484K N501Y D614G A701V	E: P71L N: T205I ORF1a: K1655N	Genome Spike protein NCBI	Increased transmissibility: 25% . Potential increase in risk of death during hospitalization (20%). Impacts immune escape after infection and after vaccination.
Gamma >PANGO >BV-BRC	P.1, B.1.1.28.1, 20J/501Y.V3	Brazil, Jul 2020	L18F T20N P26S D138Y R190S K417N/T E484K N501Y D614G H655Y T1027I V1176F	ORF1ab: S1188L, K1795Q, del:11288:9 ORF3a: S253P ORF8: E92K N: P80R	Genome Spike protein UniProt Spike protein NCBI	Increased transmissibility: 38% . No impact reported on disease severity. Impacts immune escape after infection and after vaccination.
Delta >PANGO >BV-BRC	B.1.617.2, 20A/452R	India, Dec 2020	T19R (G142D) 156del 157del R158G L452R T478K	nsp3:P1469S nsp12:P323L, G671S nsp13:P77L ORF3a:S26L M:I82T ORF7a:V82A, T120I N:D63G, R203M,	Genome Spike protein NCBI	Increased transmissibility: 97%

COVID - 19

Variant of Interest (VOI): A variant with specific genetic markers that have been associated with changes that may impact public health.

Lineage	Synonyms	Emergence	Spike variants	Other variants	Consensus sequences	Phenotypes
Epsilon >PANGO B.1.427 >PANGO B.1.429	B.1.427, California(CA) B.1.429, CAL.20C	USA, Sep 2020	S13I W152C L452R D614G	ORF1a: T265I, (S3158T), (I4205V) ORF1b: P314L, (P976L), D1183Y ORF3a: Q57H N: T205I	Genome Spike protein NCBI	Increased transmissibility: 20%. Decreased neutralization by convalescent plasma and vaccines 
Zeta >PANGO	P.2, B.1.1.28.2	Brazil, Oct 2020	E484K (F656L) D614G (T859I) V1176F			No impact on public health reported (April 2021).
Eta >PANGO	B.1.525, 20A/S:484K	Worldwide, Dec 2020	(Q52R) A67V Del 69-70 Del 144 E484K D614G Q677H F888L	ORF1ab: L4715F, E:L21F, E:I82T, del:11288:9, del:21765:6, del:28278:3		Potential reduction in neutralization by some monoclonal antibody treatments
Theta >PANGO	P.3,B.1.1.28.3, 21E	Philippines, Jan 2021	E484K N501Y D614G P681H E1092K H1101Y V1176F	ORF1ab: L3201P, D3681E, L3930F, P4715L ORF8: K2Q N: R203K, G204R		Increased transmissibility. Potential reduction in neutralization by some monoclonal antibody treatments.
Iota >PANGO	B.1.526, 21F	USA, Nov 2020	(L5F) T95I D253G (S477N) (E484K) D614G (A701V)	ORF1ab: del3675-3677		Potential reduction in neutralization by some monoclonal antibody treatments.
Kappa >PANGO	B.1.617.1, 20A/S:154K	India, Oct 2021	(T95I) G142D E154K L452R E484Q D614G P681R Q1071H			Increased transmissibility. Potential reduction in neutralization by some monoclonal antibody treatments.
Lambda >PANGO	C.37, B.1.1.1.C37	Peru, Dec 2020	G75V T76I Del 246-252			Increased transmissibility

Origine del Covid -19: aspetti controversi

- È geneticamente molto dissimile dal MERSCov (2012)
- Il ceppo che ha dato origine alla pandemia presenta solo l'80% del genoma simile a quello del SARSCov (isolato nel 2003), mentre del restante 20% non è stata ancora individuata l'origine
- Già il primo ceppo Covid-19 ha presentato un'alta affinità ai recettori umani (ACE2) (verifiche con modelli di omologia strutturale), insolita nei fenomeni di spillover
- Gli studi epidemiologici non confermano la tesi cinese della diffusione dal mercato ittico di Wuhan
- Casi isolati di polmonite atipica (ricondotti successivamente al Covid) sembra siano comparsi già a novembre, anche in Italia; studi di filogenetica indicano che alcune varianti pre-Covid-19 siano circolate nel mondo già da ottobre 2019

Origine del Covid -19

- Si è ipotizzato un salto di specie (spillover) dal pipistrello, ma i virus del pipistrello più simili al Covid-19 portano ancora importanti differenze genetiche che richiedono ulteriori spiegazioni
- Ipotizzato il pangolino malaisiano, come ospite intermedio, il virus più simile al Covid-19, presenta comunque altre importanti differenze (sito di clivaggio della furina della proteina Spike)

**LA QUESTIONE RIMANE APERTA:
VIRUS NATURALE (SPILLOVER) ... o piuttosto
PRODOTTO DI MANIPOLAZIONE GENETICA?**

Da dove provengono i microrganismi che possono essere utilizzati come armi biologiche?

1. Dal loro habitat naturale

- **dagli animali che ne costituiscono il serbatoio**
- **dalle aree dei focolai epidemici**

2. Dalle biobanche dei microrganismi ed organizzazioni come la statunitense ATCC (American Type Culture Collection)

- **acquisto con credenziali autentiche... o false**

3. Dai laboratori di ricerca (BSL3 e BSL4)

Origine dei microrganismi

Il concetto di Biosecurity

In aumento il numero dei BSL3 e BSL4



La criticità dei laboratori, soprattutto impegnati nella ricerca, è associata al rischio di:

- **Fuoriuscita di microrganismi a causa di incidenti**
- **Rischio di furto per uso illecito e malevolo**

Il rischio biologico



Contesto

Quali sono i principali scenari di rischio biologico?

- 1. Attacchi militari**
- 2. Attentati terroristici e sabotaggi**
- 2. Focolai epidemici in aree non endemiche che possono evolvere in epidemie e a loro volta in pandemie**

Scenari di rischio biologico

1. Attacchi militari

2. Attentati terroristici e sabotaggi

2. Focolai epidemici in aree non endemiche che possono evolvere in epidemie e a loro volta in pandemie

➤ **Insorgenza improvvisa, in un gruppo più o meno consistente di individui, di una patologia di tipo infettivo o di una tossinfezione riconducibile a patogeni non autoctoni**

Il disarmo

Protocollo di Ginevra

Sottoscritto nel 1925: semplice dichiarazione di intenti

Convenzione sulle armi biologiche BWC (Biological Weapons Convention)

- **Aperta alle firme il 10 aprile 1972, entrata in vigore il 26 marzo 1975**
- **Inizialmente ratificata da 22 Paesi**
- **Attualmente ratificata da 183 Paesi**
- **Redatta nelle 6 lingue ufficiali delle Nazioni Unite (inglese, francese, spagnolo, russo, arabo, cinese)**

Convenzione sulle armi biologiche BWC (Biological Weapons Convention)

- **Comprende 15 articoli e documenti supplementari redatti a conclusione delle varie Conferenze di Revisione**
- **Le Conferenze di Revisione si tengono ogni 5 anni (la prossima entro il 2021)**
- **Manca di meccanismi di verifica**
- **CBMs (Confidence Building Measures): documenti informativi scambiati annualmente su base volontaria**

Genome Editing (Tecniche di editing genomico)

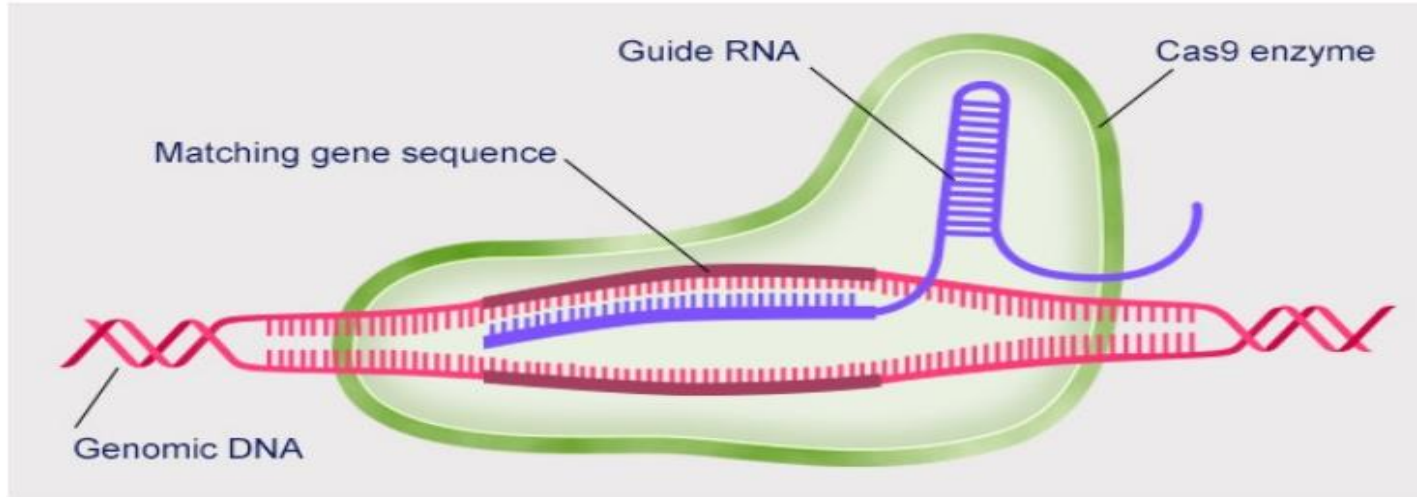
Antecedenti al 2012: Nucleasi a dita di Zinco, Talen

CRISPR-Cas

Tecnica avanzata che consente di inserire, rimuovere o alterare geni o altre sequenze in qualsiasi punto del genoma

**Premi Nobel 2020 per la chimica:
Emanuelle Charpentier, Jennifer A. Doudna**

Le Biotecnologie nella manipolazione dei microrganismi



CRISPR Cas-9

Sistema di forbice molecolare che taglia la doppia elica del DNA in punti stabiliti dal ricercatore

CRISPR

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

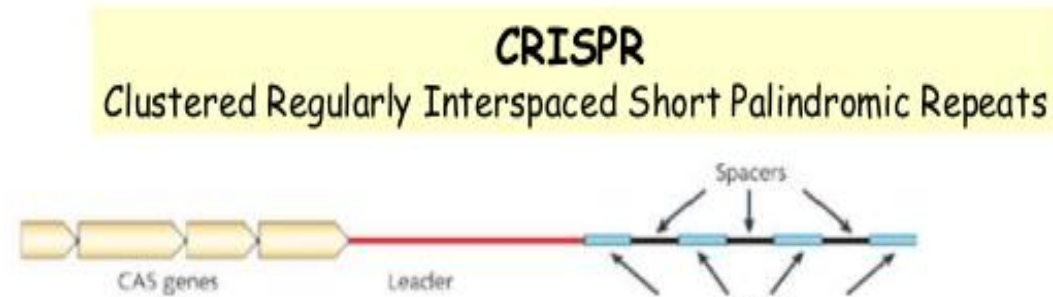


- Nel 1993 Francisco Mojica dell'Università di Alicante (Spagna) osservò nel genoma di un microrganismo la presenza di sequenze ripetute identiche (REPEATS), alternate con altre sequenze variabili (SPACERS)
- Queste REPEATS erano sequenze palindromiche
- Esempio di palindromo: itopinonavevanonipoti

Palindrome genetica

In genetica una sequenza palindromica è quella che letta in un'elica in una direzione, è identica a quella dell'elica opposta letta nell'altra direzione. Esempio:

GCATATGC
CGTATACG



CRISPR

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats



- **Mojica individuò anche un gruppo di geni associati che chiamò geni Cas (CRISPR associated)**
- **Negli anni successivi scoprì che gli spaziatori (SPACER) erano piccoli tratti di DNA proveniente da virus che in precedenza avevano attaccato i microrganismi in studio**

CRISPR

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats



- **Mojica ebbe allora l'intuizione che gli SPACER delle regioni CRISPR fossero essenzialmente delle banche di memoria di sequenze virali ostili e che il sistema CRISPR servisse ai batteri per difendersi dai virus. Ma come?**

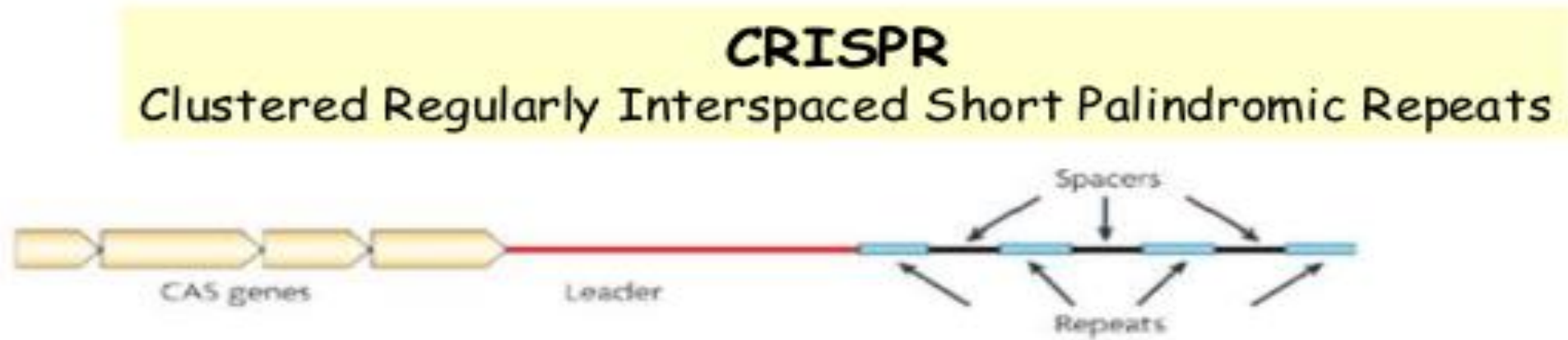
CRISPR

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats



- **Grazie ai geni Cas!**
- **Il prodotto di questi geni è una sorta di forbice molecolare, ovvero endonucleasi che tagliano il genoma del batterio in punti specifici. In particolare là dove riconoscono le sequenze SPACER. In questo modo tagliuzzano le sequenze virali, e ne impediscono la replicazione.**

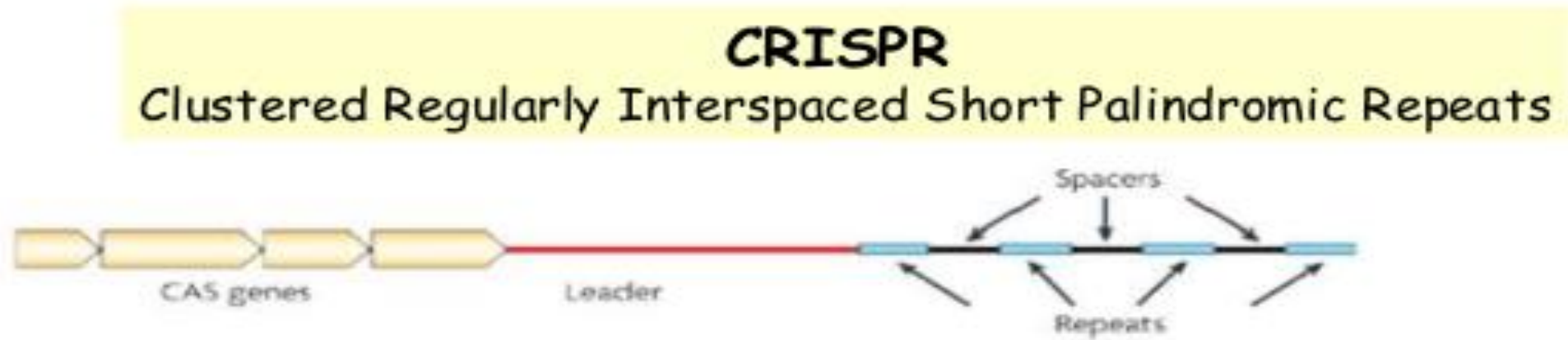
Le Biotecnologie nella manipolazione dei microrganismi



In conclusione:

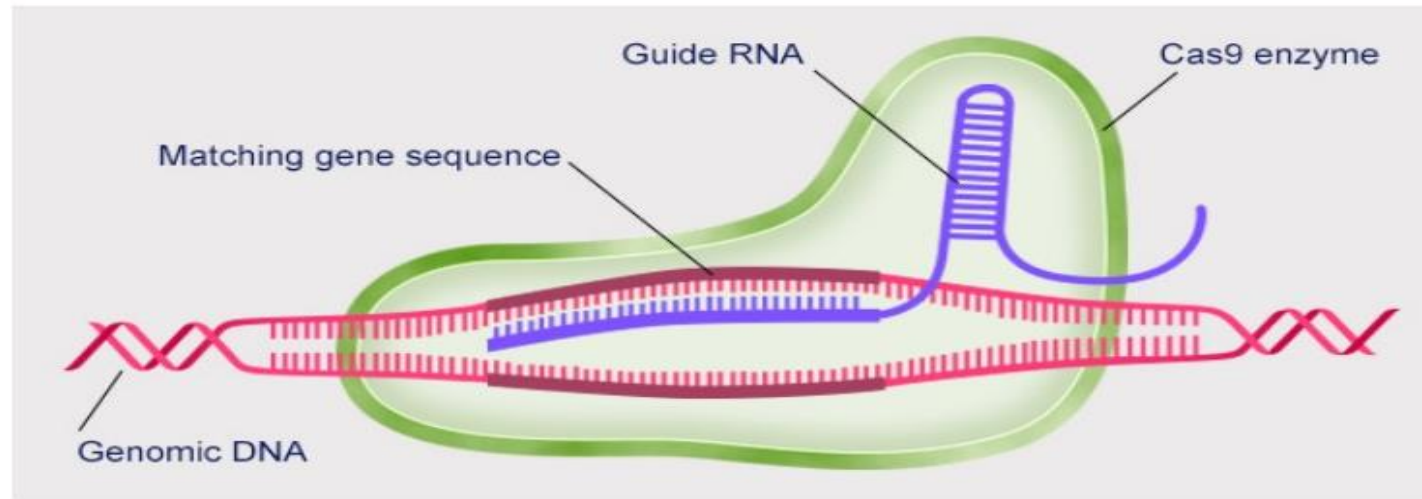
- **Le regioni CRISPR sono presenti nel genoma della gran parte dei batteri (70% nei Batteri, 90% degli Archea)**
- **Sono essenzialmente delle banche di memoria di sequenze virali ostili (SPACERS)**
- **Il sistema CRISPR conferisce nei batteri resistenza a quei virus che contengono nel proprio genoma una sequenza identica o strettamente correlata a quella contenuta nei CRISPR sotto forma di SPACERS**

Le Biotecnologie nella manipolazione dei microrganismi



- Furono però le scienziate **Emanuelle Charpentier e Jennifer Doudna** che ebbero l'idea di sviluppare il sistema **CRISPR Cas** come tecnica di genome editing.
- Per questo lavoro nel **2020** hanno ricevuto il premio Nobel per la chimica.
- Il sistema **CRISPR Cas** ha avuto infatti un successo straordinario perché, oltre che essere preciso ed efficace, è anche molto semplice, veloce ed economico

CRISPR-Cas-9



- Il Kit CRISPR Cas - 9 comprende fundamentalmente l'RNA guida (blu), e l'enzima endonucleasi (o forbice molecolare) Cas-9 (verde)
- Il complesso Cas-9 ed RNA guida scansiona la doppia elica del DNA genomico (rosso) tramite l'RNA guida e, una volta individuato il sito da tagliare (matching gene sequence), Cas-9 srotola la doppia elica, si appaia tramite l'RNA guida e taglia la doppia elica nel punto desiderato

CRISPR-Cas-9

Possibili applicazioni in medicina:

- **Terapia genica (patologie a base genetica)**
- **Cura dei tumori**
- **Terapie virali (attraverso la rimozione di specifiche sequenze di virus integrati nel DNA es. HIV)**

Effetti degli sviluppi delle biotecnologie

- **Manipolazione dei microrganismi al fine di renderli più potenti ed efficaci come armi biologiche, ad es. multi-resistenti agli antibiotici (batteri), più contagiosi e virulenti, oppure in grado di colpire specifiche fasce di età o etnie**
- **Produzione su larga scala di tossine altrimenti di difficile produzione; ottimizzazione di alcune caratteristiche naturali delle tossine**
- **Alterazione delle capacità veicolanti degli insetti vettori**

CRISPR-Cas-9

- **Manipolazione dei microrganismi per renderli più efficaci come armi biologiche**

CRISPR-Cas-13

- **Manipolazione dei virus ad RNA a singola elica**

Le Biotecnologie nella manipolazione dei microrganismi

- **Modelli di simulazione basati su I.A. potrebbero ottimizzare una deliberata diffusione di armi biologiche e/o selezionare target per fasce di età, etnia, ecc.**
- **Designer babies: bambini programmati con determinate caratteristiche**
- **Nel Report US «2016 Worldwide Threat Assessment» il genome editing è elencato tra le armi di distruzione di massa (WMD)**

Biotecnologie e Neuroscienze

- **Alcuni Stati, come la Cina, stanno da molti anni investendo risorse ingenti sulle Neuroscienze**
- **I neuropeptidi sono molecole naturali, difficili da rilevare ma estremamente potenti.**
- **Minimi squilibri nell'organismo possono comportare gravi conseguenze sulle capacità mentali fino a diventare letali**

Nuovi obiettivi strategici?

- **Manipolazione dei microrganismi al fine di renderli capaci di aggredire in modo selettivo il Sistema Nervoso, con determinate conseguenze neurologiche, in modo diretto o tramite la produzione di neuropeptidi**
- **Possibili effetti: alterazioni della capacità cognitive e di elaborazione del pensiero, disordini mentali, ecc...**



GRAZIE

