

# Proteine terapeutiche

Biofarmaci naturali	Proteine di origine estrattiva prodotte per uso clinico
Farmaci biotecnologici Prima generazione	Proteine native prodotte con la tecnica del DNA ricombinante
Seconda generazione	Proteine naturali modificate (mutazione di un singolo o pochi a.a., iper glicosilazione, peghilazione...) che mantengono la stessa attività biologica ma hanno un migliorato profilo di efficacia/tollerabilità o un profilo farmacocinetico più idoneo.
Terza generazione	Proteine altamente modificate (mutazioni di molti anticorpi, chimere) per ottenere molecole con attività anche differenti dalla proteina naturale.

# Problemi dei biofarmaci naturali

- prodotti naturalmente da un organismo vivente
  - Difficoltà di estrazione
  - La somministrazione di ormoni da animali (insulina) poteva causare l'attivazione di una risposta immune
  - Pericolo di trasmissione di agenti infettivi tra specie o individui (malattia di Creutzfeldt-Jakob in pazienti trattati con ormone della crescita umano)

# Proteine terapeutiche

Biofarmaci naturali	Proteine di origine estrattiva prodotte per uso clinico
Farmaci biotecnologici Prima generazione	Proteine native prodotte con la tecnica del DNA ricombinante
Seconda generazione	Proteine naturali modificate (mutazione di un singolo o pochi a.a., oppure iper glicosilazione, pegilazione...) che mantengono la stessa attività biologica ma hanno un migliorato profilo di efficacia/tollerabilità o un profilo farmacocinetico più idoneo.
Terza generazione	Proteine altamente modificate (mutazioni di molti aa, chimere) per ottenere molecole con attività anche differenti dalla proteina naturale (ancora in fase di ricerca)

- I farmaci biotecnologici di prima generazione sono semplici copie di proteine umane prodotte attraverso la trasfezione del gene umano in un appropriato sistema di espressione ma....
- Problemi intrinseci delle proteine
  - Scarsa stabilità
  - Tendenza all'aggregazione
- Problemi farmacocinetici
  - Breve  $t_{1/2}$
  - Scarso o nullo assorbimento
- Problemi farmacodinamici
  - Bassa affinità
  - Scarsa selettività
- Immunogenicità

# Proteine terapeutiche

Biofarmaci naturali	Proteine di origine estrattiva prodotte per uso clinico
Farmaci biotecnologici Prima generazione	Proteine native prodotte con la tecnica del DNA ricombinante
Seconda generazione	Proteine naturali modificate (mutazione di un singolo o pochi a.a., oppure iper glicosilazione, pegilazione...) che mantengono la stessa attività biologica ma hanno un migliorato profilo di efficacia/tollerabilità o un profilo farmacocinetico più idoneo.
Terza generazione	Proteine altamente modificate (mutazioni di molti aa, chimere) per ottenere molecole con attività anche differenti dalla proteina naturale (ancora in fase di ricerca)

# Strategie per migliorare le caratteristiche delle proteine naturali

1. Manipolazione della struttura primaria
  - Mutazioni/delezioni a livello dei "loops" per ridurre la flessibilità, con conseguente diminuzione della suscettibilità alla proteolisi
  - Mutazione sito specifica per inserire siti addizionali di glicosilazione (eritropoietina)
  - Mutazione di epitopi immunogenici (eritropoietina)
  - Mutazione sito specifica cisteina/serina (IFN $\beta$ 1b, G-CSF)

# L'importanza della glicosilazione

**Table IV. Functions of Glycoprotein Glycans**

Type	Function
Physicochemical	Modify solubility, electrical charge, mass, size, and viscosity in solution Control protein folding Stabilize protein conformation Confer thermal stability and protection against proteolysis
Biological	Regulate intracellular trafficking and localization Determine circulation half-life Modify immunological properties Modulate activity Act as cell surface receptors for lectins, antibodies, toxins, and so forth Participate in cell-cell interactions

Aranesp<sup>®</sup>  
(darbepoetin alfa)

Epo

Amgen

Anemia

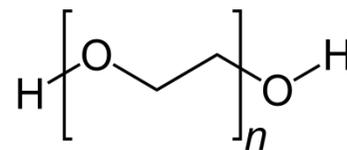
Additional  
glycosylation sites

Increased serum half-life;  
weaker receptor binding

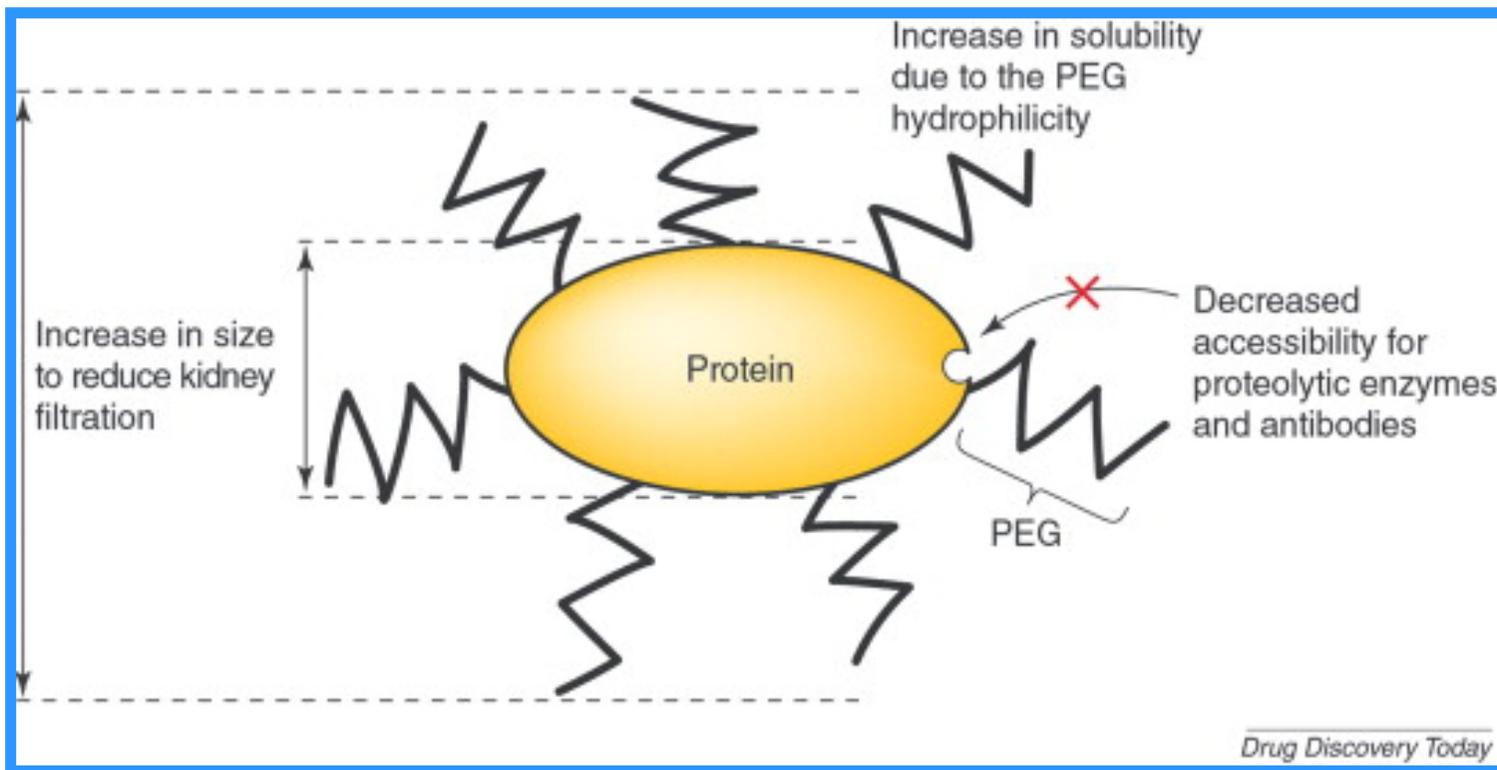
# Strategie per migliorare le caratteristiche delle proteine naturali

## 2. Modificazioni chimiche post traslazionali

- Peghilazione: la proteina viene legata al polietilene glicole, polimero altamente flessibile che aumenta significativamente la dimensione della proteina, migliorandone la farmacocinetica, riducendo l'immunogenicità e l'aggregazione



Polietilene glicole



**Table 1. Currently Marketed Pegylated Agents**

PEG Conjugate	Generic Name (Trade Name)/ Manufacturer (FDA Approval Date)	Bioactivity of Native Agent	Main Effect of Pegylation	Reason for Treatment
ADA	Pegademase (Adagen)/ Enzon (March 1990)	Enzyme replacement, reverses symptoms of ADA deficiency	Longer half-life, reduced immune response <sup>11</sup>	SCID as a result of ADA deficiency
Asparaginase	Pegaspargase (Oncaspar)/ Enzon (February 1994)	Hydrolyzes asparagine, on which leukemic cells are dependent	Longer half-life, reduced immune response <sup>5</sup>	In combination chemotherapy, for treatment of acute lymphoblastic leukemia in patients hypersensitive to L-asparaginase
Granulocyte colony-stimulating factor	Pegfilgrastim (Neulasta)/ Amgen (January 2002)	Stimulation of neutrophil production	Longer half-life, self-regulating clearance <sup>12</sup>	Prophylaxis against severe neutropenia and its complications during myelosuppressive chemotherapy
Interferon $\alpha$ 2b	Peginterferon $\alpha$ 2b (PEG-Intron)/Schering (January 2001)	Antiviral cytokine	Slower clearance, sustained serum concentration <sup>13</sup>	Hepatitis C in patients with normal liver function
Interferon $\alpha$ 2a	Peginterferon $\alpha$ 2a (Pegasys)/Roche (October 2002)	Antiviral cytokine	Slower clearance, sustained serum concentration <sup>2</sup>	Hepatitis C in patients with compensated liver disease
Stealth PEG liposomes for delivery of doxorubicin	Pegylated liposomal doxorubicin (Caelyx, Doxil)/Alza (June 1999)	Antitumor anthracycline	Slower clearance, greater distribution into tumors <sup>7, 14</sup>	Kaposi's sarcoma, refractory ovarian cancer

PEG = polyethylene glycol; FDA = Food and Drug Administration; ADA = adenosine deaminase; SCID = severe combined immunodeficiency disease.

- Altre modifiche intenzionali nel disegno di farmaci biotecnologici come:
  - Coniugazione: modificazione covalente di una proteina con una molecola più piccola (ed es. coniugazione di un anticorpo monoclonale con una molecola citotossica)
  - Radiomarcatura: incorporazione di un isotopo radioattivo nella molecola.

Ontak <sup>®</sup> (denileukin diftotox)	Diphtheria toxin-IL-2	Seragen/Ligand	Cancer	Fusion	Targets cancer cells
---	--------------------------	----------------	--------	--------	----------------------

Kadcyla <sup>®</sup> Trastuzumab emtansine	DM1-trastuzumab	MCC linker	Cancer
---	-----------------	------------	--------

# Strategie per migliorare le caratteristiche delle proteine naturali

## 2. Modificazioni chimiche post traslazionali

- Insulina detemir (acilazione LysB29, Novo Nordisk)
- INF $\alpha$ , peptide GLP1, desmopressina (legame di acidi grassi a residui attivi sulla superficie della proteina)
- Migliorano il legame con le proteine plasmatiche e quindi prolungano l'emivita

# Strategie per migliorare le caratteristiche delle proteine naturali

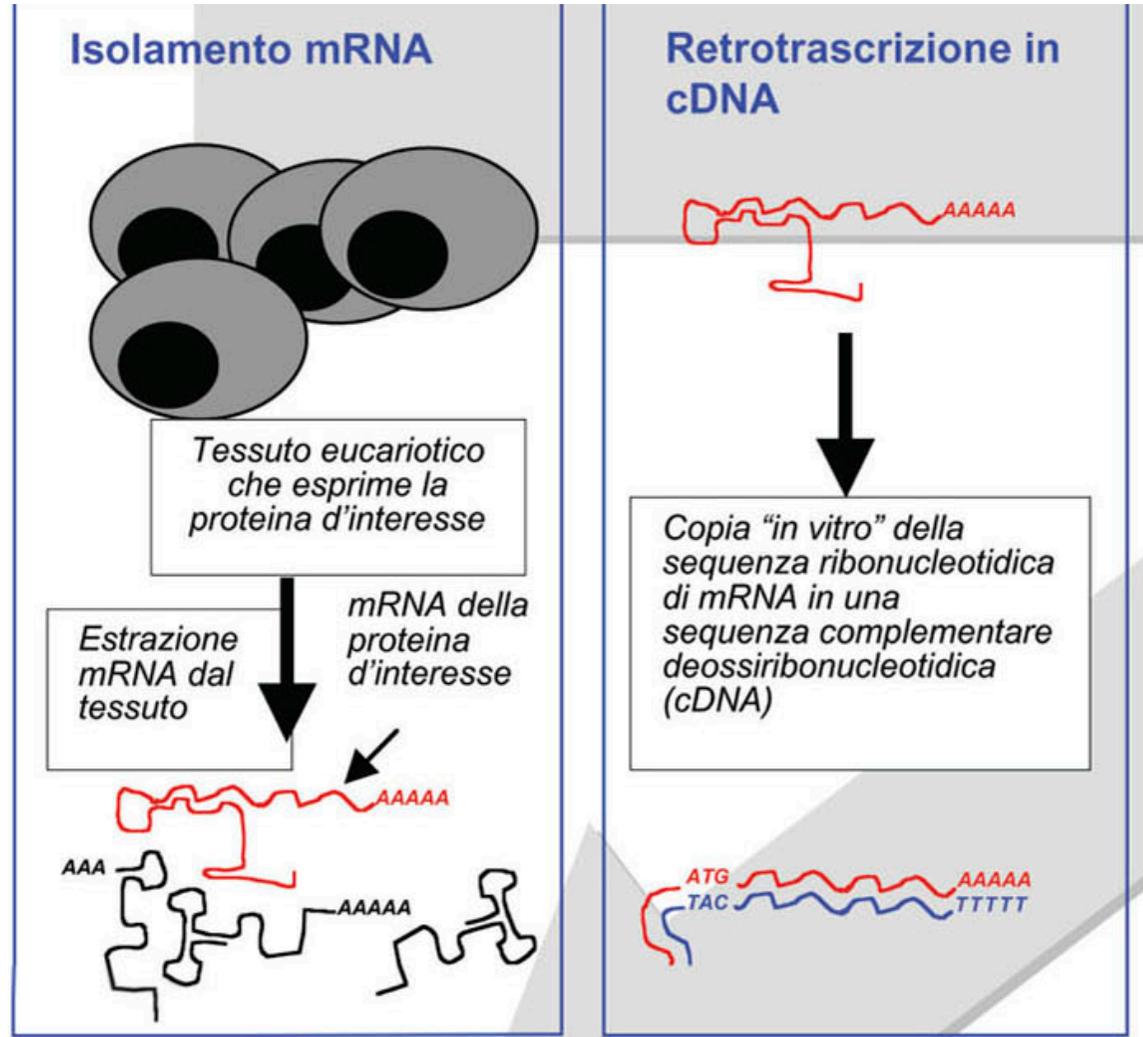
## 3. Utilizzo di partners di fusione

- Fusione omologa (etanercept)
- Fusione eterologa (regione FC degli anticorpi IgG) aumenta significativamente l'emivita delle proteine; generalmente non ne modifica struttura e funzione; tende a dimerizzare, aumentando in molti casi l'affinità della proteina per il suo recettore

# Proteine terapeutiche

Biofarmaci naturali	Proteine di origine estrattiva prodotte per uso clinico
<b>Farmaci biotecnologici</b> Prima generazione	Proteine native prodotte con la tecnica del DNA ricombinante
Seconda generazione	Proteine naturali modificate (mutazione di un singolo o pochi a.a., oppure iper glicosilazione, pegilazione...) che mantengono la stessa attività biologica ma hanno un migliorato profilo di efficacia/tollerabilità o un profilo farmacocinetico più idoneo.
Terza generazione	Macromolecole (compresi acidi nucleici e proteine altamente modificate, mutazioni di molti aa, chimere) con attività anche differenti dalla proteina naturale (ancora in fase di ricerca)

# Preparazione di proteine ricombinanti

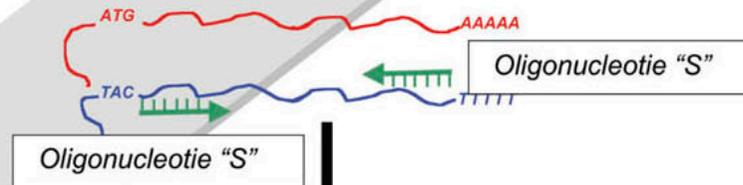


# Preparazione di proteine ricombinanti

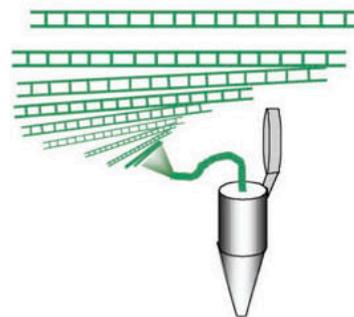
## Isolamento, amplificazione e conversione del cDNA in doppio filamento di DNA

Amplificazione tramite PCR del cDNA d'interesse:

- selezione di un oligonucleotide a singola elica complementare alla sequenza a valle dell'ATG di inizio (S);
- selezione di un oligonucleotide antisenso (AOS) complementare alla sequenza a monte del codone di stop



*Amplificazione della sequenza nucleotidica delimitata dai due oligonucleotidi.  
Purificazione del materiale amplificato  
( $> 10^{20}$  copie)*

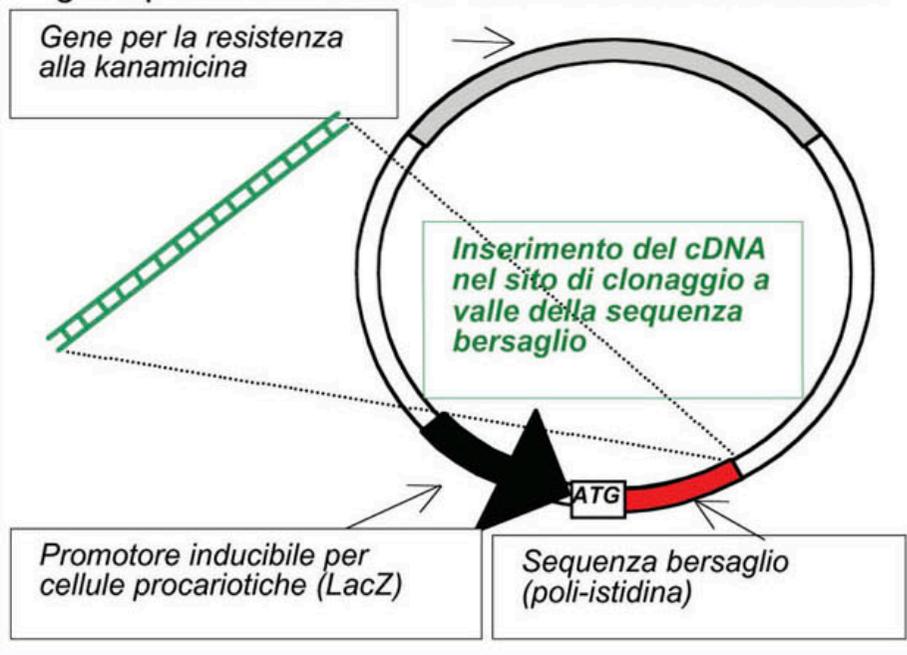


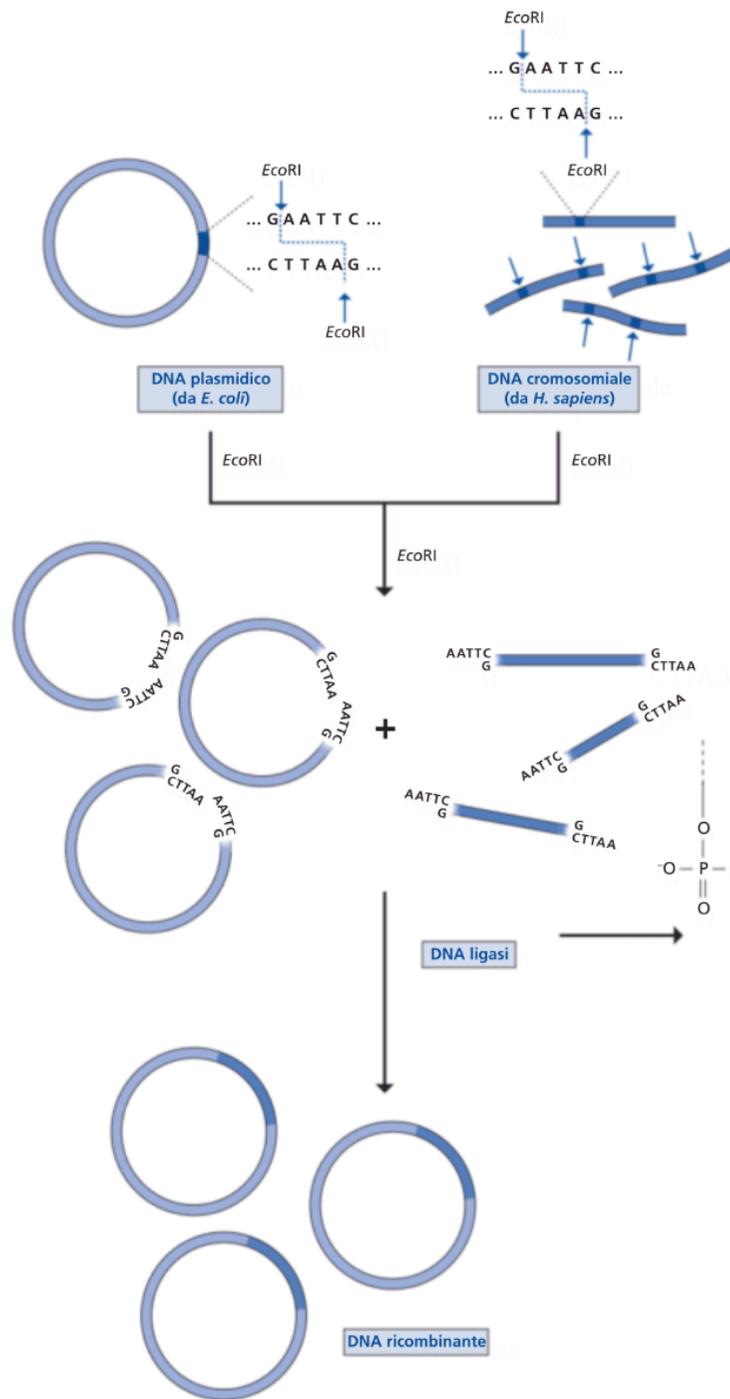
# Preparazione di proteine ricombinanti

## Inserimento del cDNA a doppia elica in un vettore di espressione per cellule procariotiche

Caratteristiche del vettore:

- sequenza bersaglio per l'isolamento della proteina clonata a valle del sito di clonaggio
- ATG di inizio trascrizione a valle della sequenza bersaglio
- promotore inducibile per la trascrizione in cellule procariotiche (*LacZ*)
- gene per la selezione del clone batterico trasformato





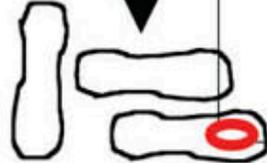
**Figura 8.2** Esempio di taglio con enzimi di restrizione e unione con DNA ligasi.

# Preparazione di proteine ricombinanti

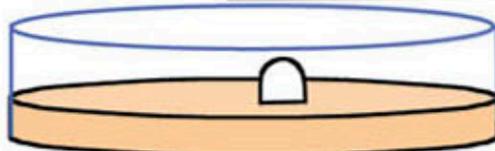
Trasformazione di *E. coli* competenti, selezione e crescita del clone trasformato



Trasformazione per shock termico:  
0°C per 30',  
42°C per 15"



Selezione in terreno semisolido (Agar) e antibiotico (kanamicina)



Colonia batterica

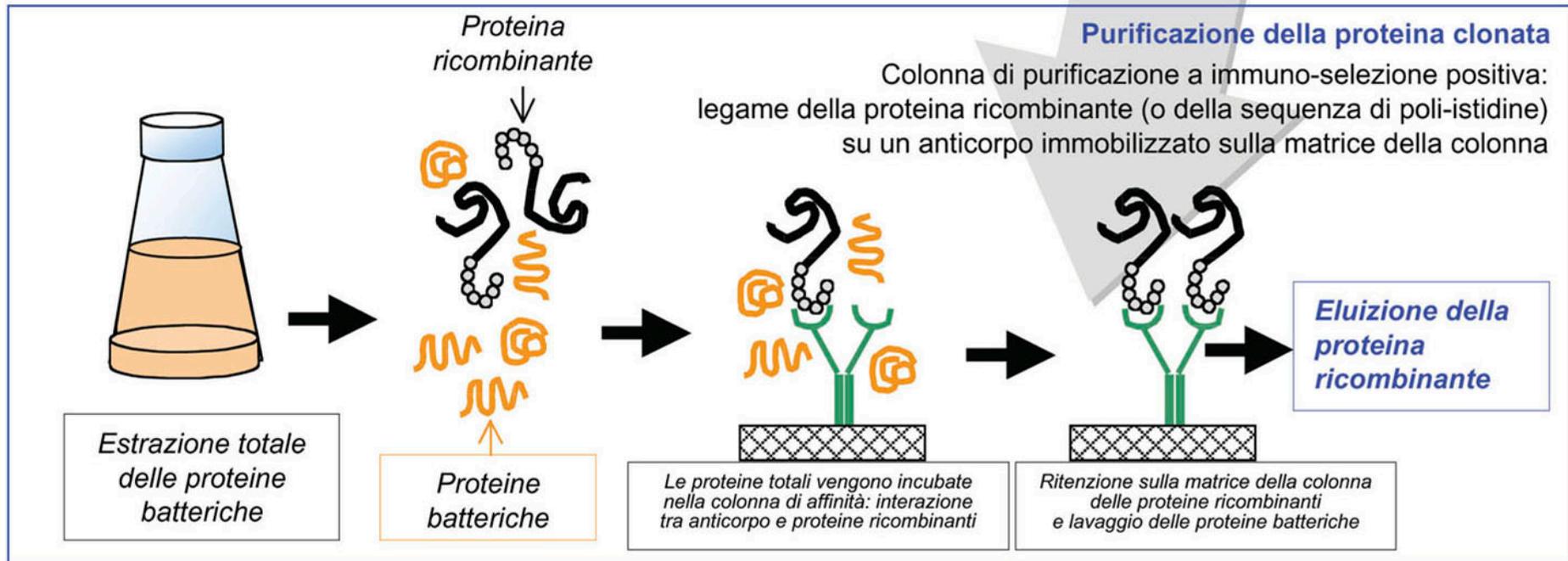
Induzione della sintesi proteica ed estrazione delle proteine totali

Coltura della colonia batterica in terreno liquido di crescita (brodo) addizionato del farmaco di selezione e dell'induttore della trascrizione proteica (IPTG)



Crescita a 37°C  
in agitazione

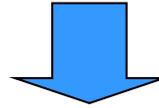
# Preparazione di proteine ricombinanti



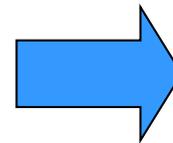
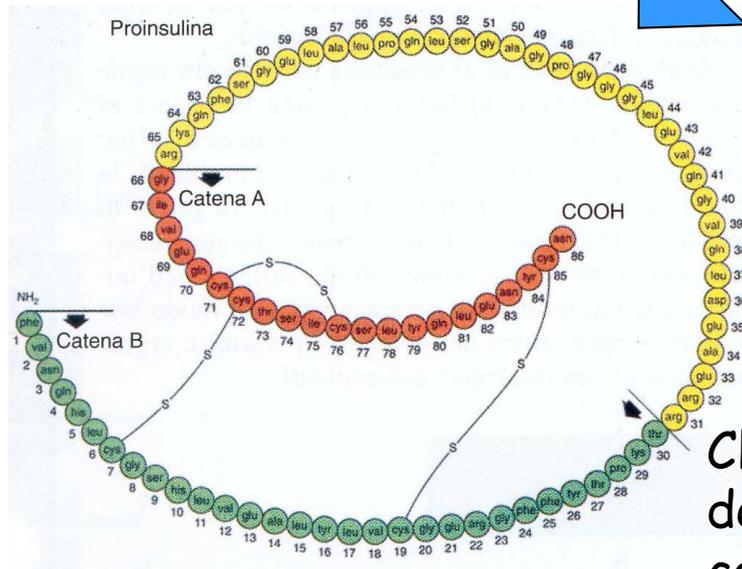
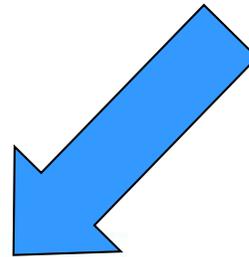
# Insulina ricombinante

- Adatta ad essere prodotta con le tecniche del DNA ricombinante
  - Non è modificata dopo la traduzione dall'aggiunta di zuccheri
  - È una proteina relativamente piccola (catena A: 21 aa, catena B: 30 aa)

# Preproinsulina

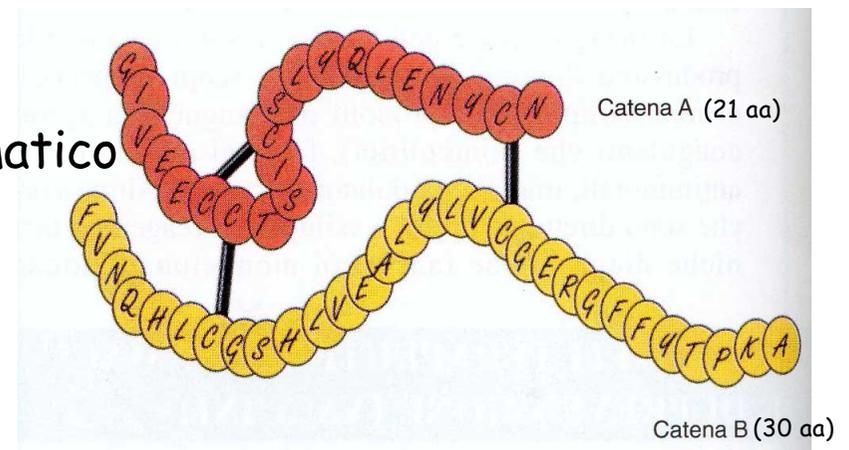


# Proinsulina



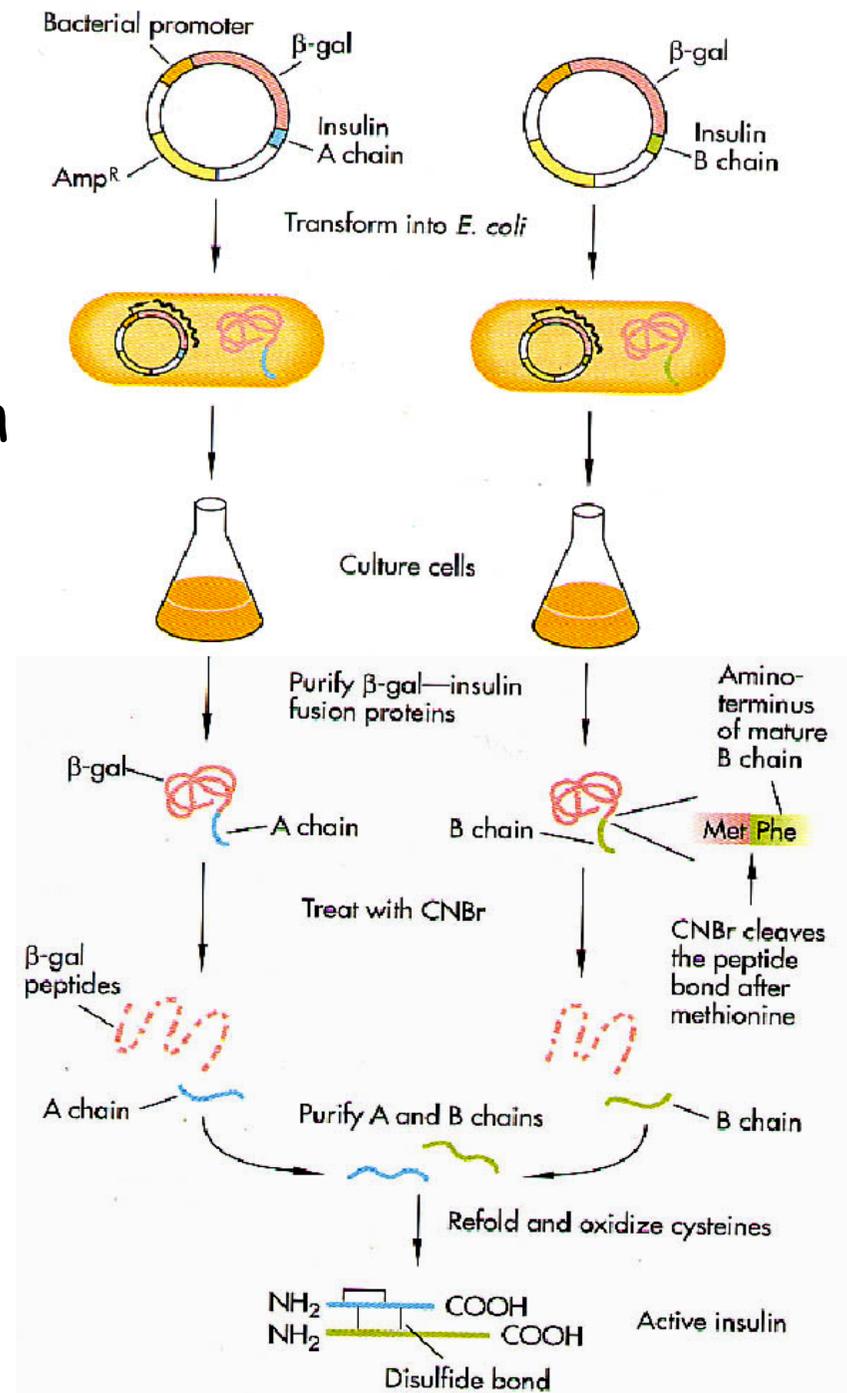
Clivaggio enzimatico  
del polipeptide  
centrale

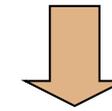
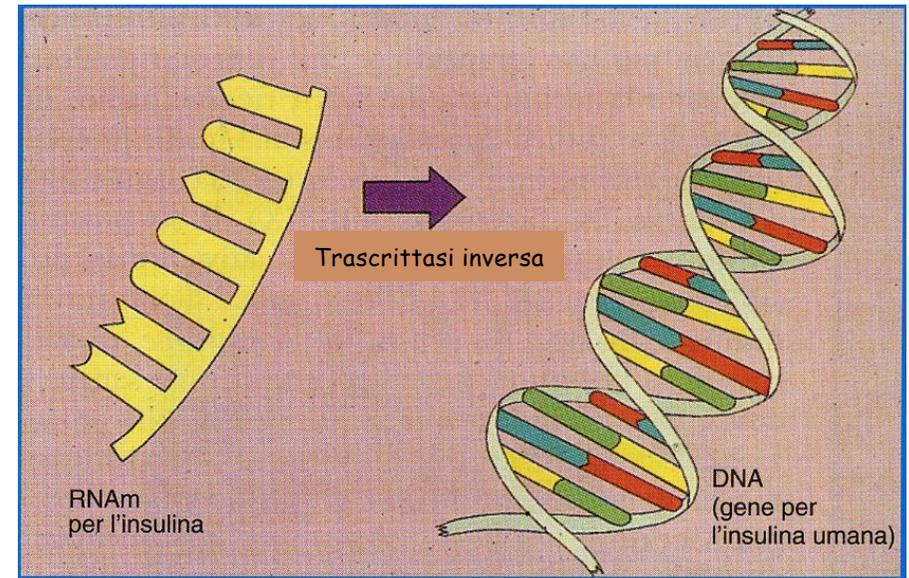
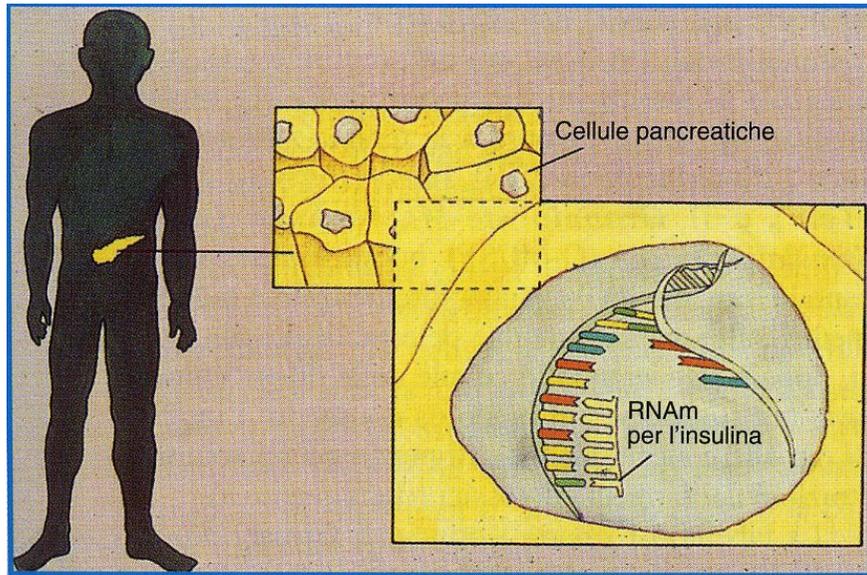
# Insulina



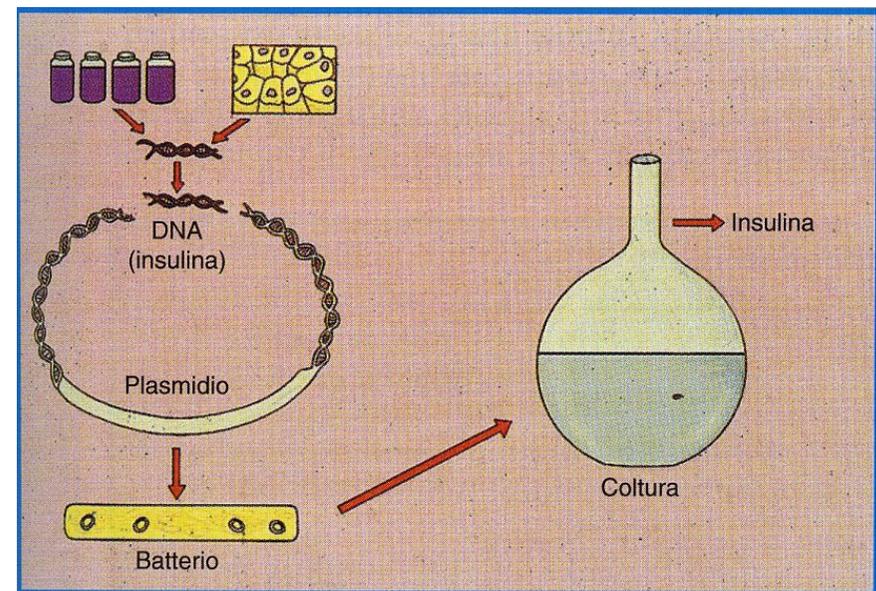
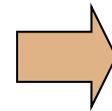
# Insulina umana (settembre 1982)

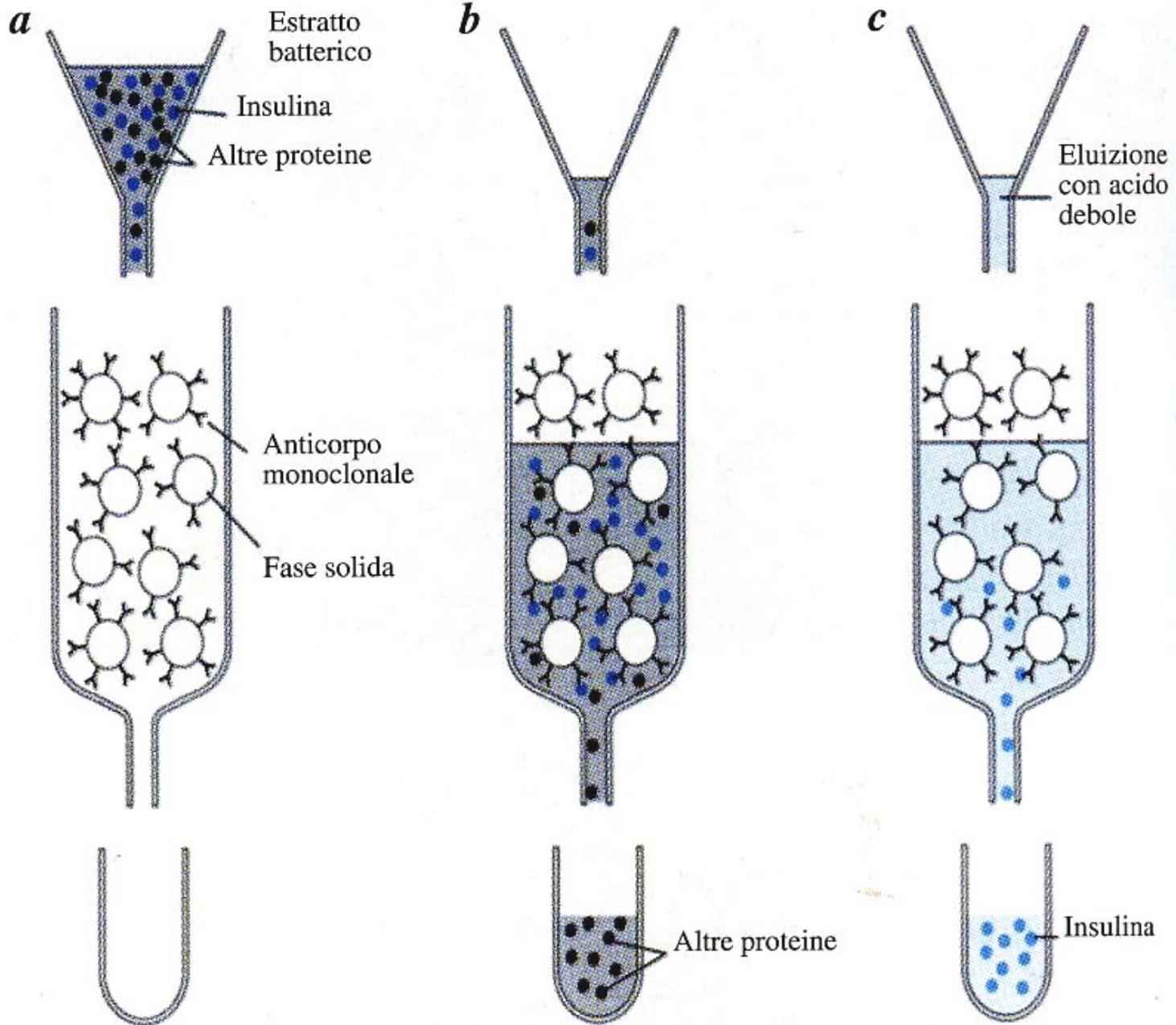
- Produzione di proinsulina, inserendo nei batteri il gene in toto e quindi convertendo la proinsulina in insulina mediante clivaggio chimico
- Produzione da parte di due colture batteriche (rispettivamente ingegnerizzate con i geni che codificano per le catene A e B) delle singole catene polipeptidiche e quindi legandole chimicamente tra loro mediante ponti disolfuro





Oppure il gene può essere sintetizzato in laboratorio legando nel corretto ordine le basi nucleotidiche; la corretta sequenza è dedotta dalla sequenza degli aminoacidi nella molecola di proinsulina





# Insuline per uso umano

Insulina	Posizione aa						
	Catena A			Catena B			
	8	10	21	28	29	30	31 & 32
Insulina umana	Thr	Ile	Asn	Pro	Lys	Thr	-
Insulina bovina	<i>Ala</i>	<i>Val</i>	Asn	Pro	Lys	Thr	-
Insulina suina	Thr	Ile	Asn	Pro	Lys	<i>Ala</i>	-
Insulina Lispro	Thr	Ile	Asn	<i>Lys</i>	<i>Pro</i>	Thr	-
Insulina-asp	Thr	Ile	Asn	<i>Asp</i>	Lys	Thr	-
Insulina glargina	Thr	Ile	<i>Gly</i>	Pro	Lys	Thr	<i>Arg &amp; Arg</i>

# Sistemi che utilizzano cellule batteriche

- Vantaggi
  - Crescita rapida
  - Facili da gestire
- Svantaggi
  - Le cellule batteriche non compiono lo stesso tipo di processi posttraslazionali delle cellule dei mammiferi (ad esempio glicosilazione)
  - Il prodotto può contenere endotossine che devono essere rimosse

# In alternativa..

- Cellule eucariote (ad esempio *Saccharomyces cerevisiae* o cellule CHO di ovaio di criceto cinese)
  - Crescita più lenta
  - Le colture sono più difficili da portare avanti
  - Aumento dei costi

	Procariote	Eucariote	
	<i>E. Coli</i>	Lievito	Cellule umane
Dimensioni e caratteristiche del DNA	4.6 Mbp, circolare	12.1 Mbp, cromosomico	2000-3000 Mbp, cromosomico
Modificazioni post-traduzionali	Nessuna	Diverse da quelle umane	Simili o identiche a quelle umane
Velocità di crescita (cicli per ora)	3.33/h	0.25/h	0.02/h
Metodo di coltivazione	Fermentazione	Fermentazione	Fermentazione (cellule in sospensione) Roller bottle (cellule in adesione)
Costo	Basso	Intermedio	Alto

# Piante transgeniche per la produzione di farmaci

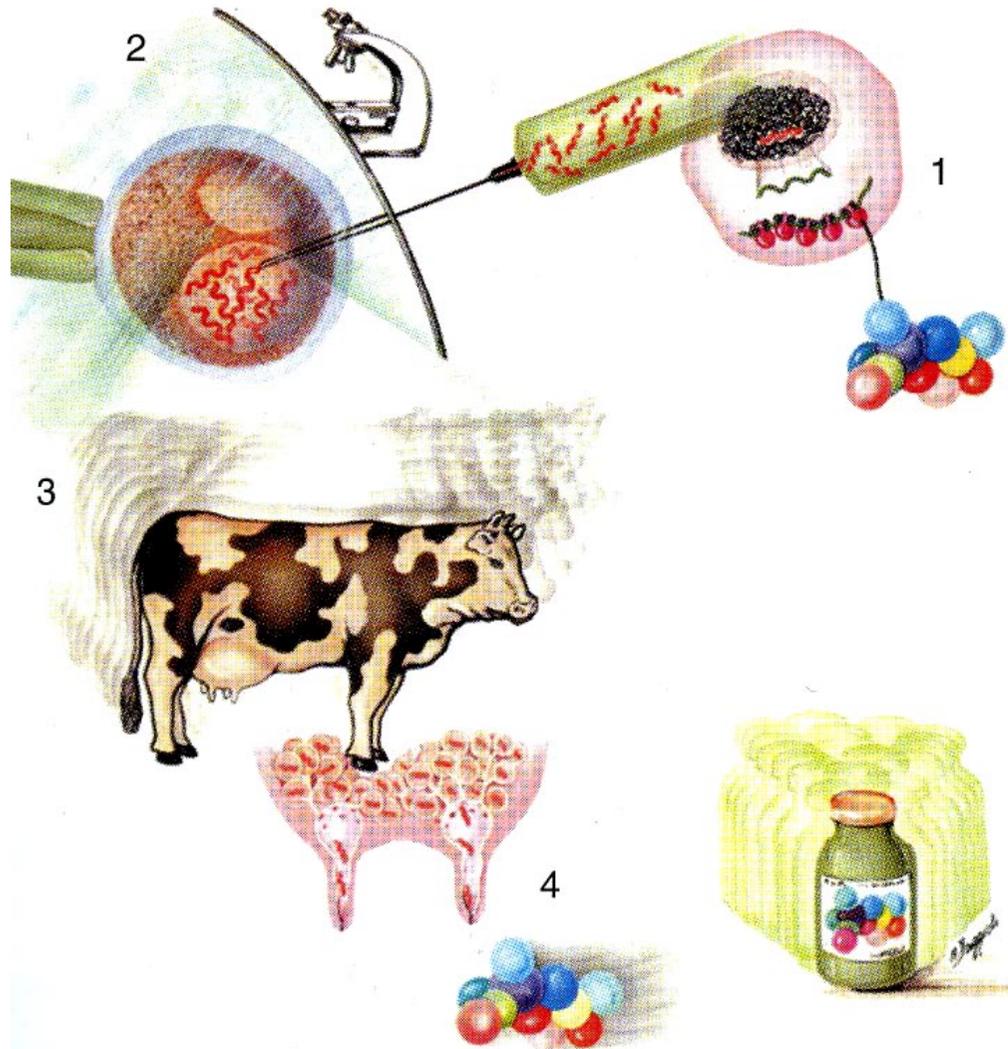


- Con la tecnica del DNA ricombinante è possibile fare esprimere nelle piante proteine quasi indistinguibili da quelle prodotte da cellule di mammifero
- Nelle cellule vegetali avviene una glicosilazione diversa e le proteine ricombinanti possono veicolare glucani vegetali che le rendono immunogeniche

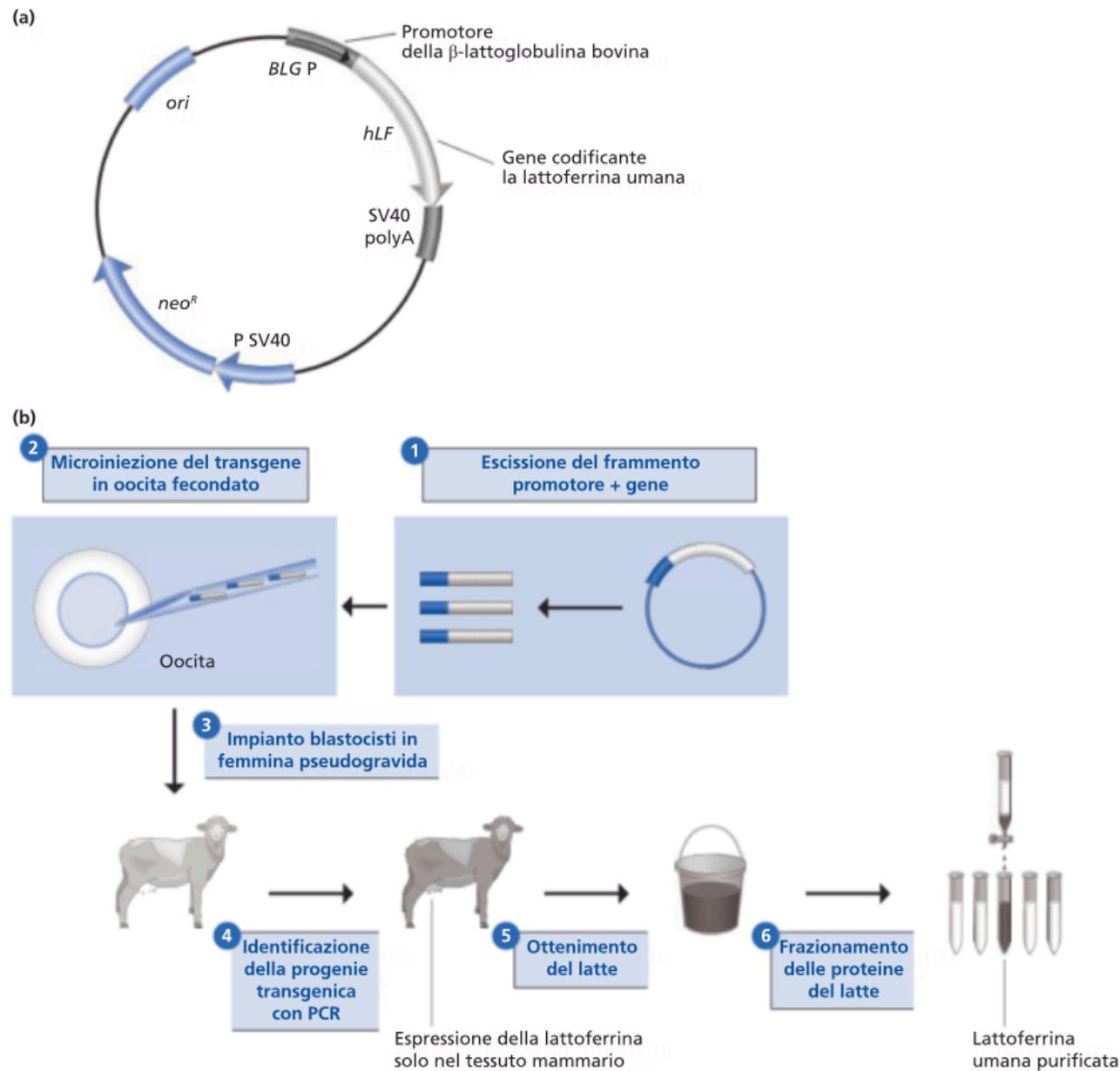
Nome	Formato	Specificità	Pianta	Proprietà	Stato di sperimentazione
<i>Avicidin</i>	IgG	Molecola epiteliale di adesione cellulare (EpCAM) correlata al colon rettale	mais	NeoRx e Monsanto	Trial clinico fase II
<i>CaroRx</i>	Iga/IgG chimerica secretoria	Principale proteina di adesione dello Streptococcus mutans agente della carie	tabacco	St. George's Hospital Medical School, Londra	Trial clinico fase II
<i>T84.66</i>	IgG ScFv ScFv + interleukin-2	Carcinoembryonic antigen (CEA), marcatore di carcinomi epiteliali	diverse		Trial clinico fase II
<i>Anti-HSV</i>	IgG1	Glicoproteina B dell'herpes simplex (HSV)-2	soia	EpicYTE Pharmaceuticals	Trial clinico fase II
<i>Anti-RSV</i>	IgG	Proteina R9 del virus respiratorio sinciziale (RSV)	soia	EpicYTE Pharmaceuticals	Trial clinico fase II
<i>38C13</i>	scFv	Idiotipo di linfociti B maligni (da cellule di linfoma linea 38C13)	piante infettate con virus	Large Scale Biology	Trial clinico fase I
<i>PIPP</i>	IgG	Gonadotropina corionica umana (hCG) Per terapia e diagnosi di tumori che producono hCG, test di gravidanza e contraccezione.	tabacco		Trial clinico fase I

**IN CLINICAL TRIALS**

# Animali transgenici per la produzione di farmaci: *gene farming*



1. Un gene che consente la produzione di una determinata molecola (ad es un composto ad attività farmacologica) viene isolato e amplificato
2. Microiniettato in un uovo fecondato bovino, il gene si inserisce nel patrimonio genetico
3. Individui così modificati potranno essere replicati mediante la clonazione
4. È possibile far esprimere il gene in un organo specifico (mammella) e al momento prestabilito, in modo da far produrre il farmaco nel latte



**Figura 8.11** Animali transgenici per la produzione di proteine terapeutiche ottenuti con la transgenesi standard. **(a)** Il vettore utilizzato contiene un promotore che permette l'espressione del transgene in cellule specifiche, come il promotore della  $\beta$ -lattoglobulina, che direzionano l'espressione nella ghiandola mammaria. **(b)** Transgenesi per la produzione e purificazione della lattoferrina da animali transgenici.



- Agosto 2006: l'EMA approva Atryn, alfa-antitrombina umana prodotta nel latte da capre transgeniche
- Il farmaco è stato approvato per la profilassi della trombosi venosa profonda e della tromboembolia in pazienti con deficit congenito di antitrombina.
- L'immissione in commercio è approvata esclusivamente per "circostanze eccezionali", assicurandosi che la ditta produttrice ne controlli rigorosamente la sicurezza.

# Animali transgenici per la produzione di farmaci: *gene farming*

Prodotto	Società produttrice	Applicazione
LATTE DI PECORA		
$\alpha_1$ -antitripsina umana	PPL, UK	Terapia dell'enfisema
Proteina C umana	PPL, UK	Terapia della trombosi
Fattori VIII e IX della coagulazione umani	PPL, UK	Terapia dell'emofilia
LATTE DI BOVINA		
Lattoferrina umana	Genzyme, MA, USA	Trasporto del ferro e attività antibatterica
LATTE DI CAPRA		
Attivatore tissutale del plasminogeno umano	Genzyme, MA, USA	Dissoluzione dei trombi
PLASMA DI SUINO		
Emoglobina umana	DNX, NJ, USA	Sostituto del plasma nelle trasfusioni

**Tabella 8.8** Sistemi biologici per la produzione di farmaci biotecnologici.

Organismo	Velocità di crescita	Costi di produzione	Resa	MPT	Ospite	Esempi di farmaci (impiego terapeutico)
Batteri	+++++	Bassi	+++++	+	<i>E. coli</i>	Insulina (diabete) Ormone della crescita (disordini della crescita) Denileuchina diftotox (linfoma a cellule T) Paratormone (osteoporosi) G-CSF (neutropenia)
Cellule eucariotiche	+++	Elevati	++ (~1 g/L)	++++	<i>S. cerevisiae</i>	Antigene superficie HBV (vaccino anti-epatite B) Adenosina deaminasi (immunodeficienze)
					Cellule Sf9*	Proteine del poliovirus (vaccino anti-poliomielite) mAB anti-EGFR (tumore metastatico del colon-retto)
					Cellule CHO	LH (infertilità) IFN $\beta$ (sclerosi multipla) TPA (infarto acuto) mAb anti-HER2 (tumore metastatico mammario)
Piante	++	Medi	+++ (~1 mg/g foglie)	++	Tabacco**	Proteina C (inibizione della coagulazione) Eritropoietina (anemia)
					Riso**	IFN $\alpha$ (epatite B e C) $\alpha$ 1-antitripsina (fibrosi cistica, emorragia)
Animali	+	Alti per transgenesi, bassi per mantenimento	+++ (~10 g/L latte)	++++	Capra	TPA (infarto acuto)
					Mucca	Lattoferrina (antibatterico)
					Coniglio	IL2 (immunoterapia dei tumori)
					Pecora	Fattore VIII (emofilia A) Fattore IX (emofilia B)

MPT: modificazioni post-traduzionali.

\* Cellule derivate da tessuto ovarico del lepidottero *Spodoptera frugiperda* rese transgeniche tramite infezione con un baculovirus ricombinante.

\*\* Specie transgeniche di *Nicotiana* e *Oryza* derivate dalla trasformazione delle cellule del callo con un plasmide ricombinante attraverso metodo diretto o tramite il batterio *Agrobacterium tumefaciens*.