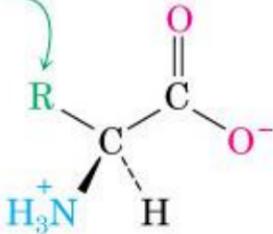


Amminoacidi, peptidi, proteine

α -amminoacidi che costituiscono le proteine

Catena laterale



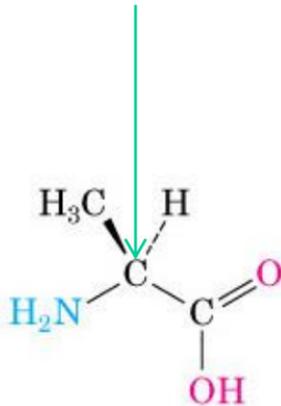
α -Aminoacido primario

Al carbonio α sono legati:

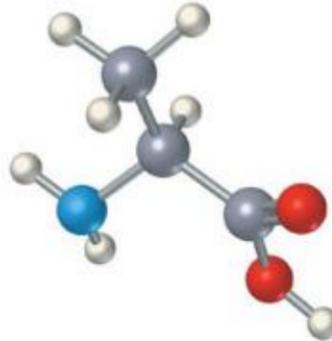
- Carbossile
- Ammine
- Catena laterale

α -amminoacidi che costituiscono le proteine

Carbonio α



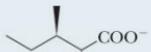
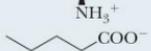
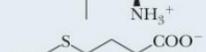
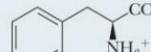
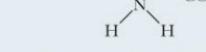
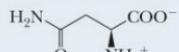
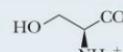
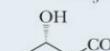
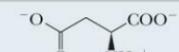
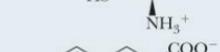
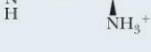
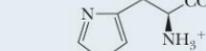
Alanina (un amminoacido)



Ala (A)

Ogni amminoacido viene codificato da una sigla a 3 lettere e da una a 1 lettera

Tabella 27.1 | 20 amminoacidi comuni che si trovano nelle proteine

Catene laterali non polari	
	Alanina (Ala, A)
	Glicina (Gly, G)
	Isoleucina (Ile, I)
	Leucina (Leu, L)
	Metionina (Met, M)
	Fenilalanina (Phe, F)
	Prolina (Pro, P)
	Triptofano (Trp, W)
	Valina (Val, V)
Catene laterali polari	
	Asparagina (Asn, N)
	Glutamina (Gln, Q)
	Serina (Ser, S)
	Treonina (Thr, T)
Catene laterali acide	
	Acido aspartico (Asp, D)
	Acido glutammico (Glu, E)
	Cisteina (Cys, C)
	Tirosina (Tyr, Y)
Catene laterali basiche	
	Arginina (Arg, R)
	Istidina (His, H)
	Lisina (Lys, K)

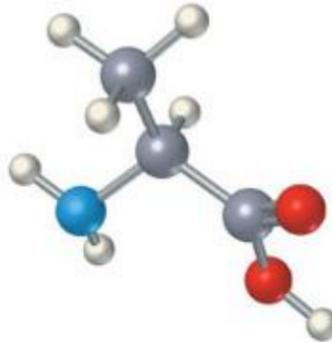
Le catene laterali determinano le diverse proprietà dei 20 amminoacidi che sono più comuni nelle proteine e che sono codificati dal DNA

* Ciascun gruppo ionizzabile è riportato nella forma presente in maggior concentrazione a pH 7.0.

Amino Acid	Abbreviation		pK ₁	pK ₂	pK _R	pI
	3- Letters	1- Letter	-COOH	-NH ₃ ⁺	R group	
Alanine	Ala	A	2.34	9.69	-	6.00
Arginine	Arg	R	2.17	9.04	12.48	10.76
Asparagine	Asn	N	2.02	8.80	-	5.41
Aspartic Acid	Asp	D	1.88	9.60	3.65	2.77
Cysteine	Cys	C	1.96	10.128	8.18	5.07
Glutamic Acid	Glu	E	2.19	9.67	4.25	3.22
Glutamine	Gln	Q	2.17	9.13	-	5.65
Glycine	Gly	G	2.34	9.60	-	5.97
Histidine	His	H	1.82	9.17	6.00	7.59
Isoleucine	Ile	I	2.36	9.60	-	6.02
Leucine	Leu	L	2.36	9.60	-	5.98
Lysine	Lys	K	2.18	8.95	10.53	9.74
Methionine	Met	M	2.28	9.21	-	5.74
Phenylalanine	Phe	F	1.83	9.13	-	5.48
Proline	Pro	P	1.99	10.60	-	6.30
Serine	Ser	S	2.21	9.15	-	5.58
Threonine	Thr	T	2.09	9.10	-	5.60
Tryptophan	Trp	W	2.83	9.39	-	5.89
Tyrosine	Tyr	Y	2.20	9.11	10.07	5.66
Valine	Val	V	2.32	9.62	-	5.96

Ogni a.a. ha gruppi dotati di reattività acida e basica

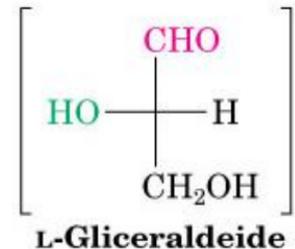
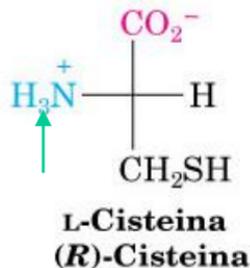
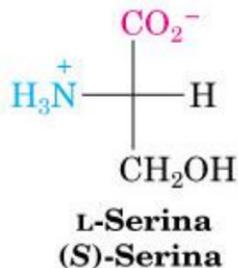
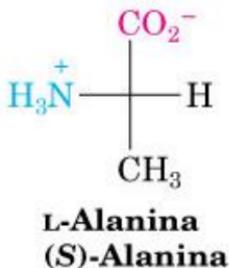
Gli aminoacidi sono molecole chirali (esclusa Gly)



Alanina (un aminoacido)

Proiezione a cunei e linee tratteggiate della (S)- Alanina

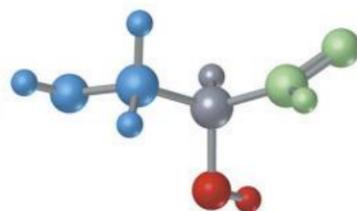
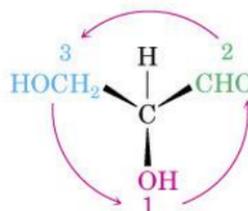
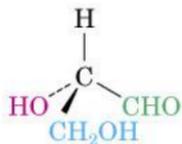
**Proiezione di Fischer degli
gli amminoacidi naturali:
vengono classificati come «L» perchè
hanno la stessa configurazione (S)
della L-gliceraldeide**



La Cys è l'unico amminoacido naturale con configurazione (R)

FIGURA 9.9 Assegnazione della configurazione alla (-)-gliceraldeide (a) e alla (+)-alanina (b). Entrambe hanno configurazione S, nonostante una sia levogira e l'altra destrogira.

(a)

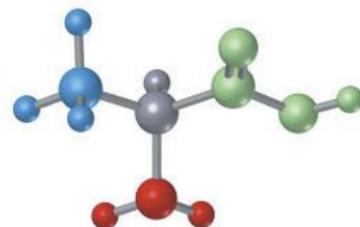
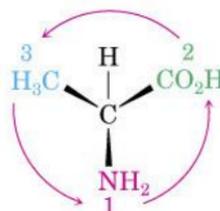
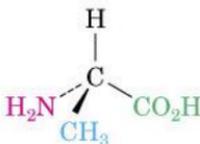


(S)-Gliceraldeide

[(S)-(-)-2,3-Diidrossipropanale]

$[\alpha]_D = -8.7^\circ$

(b)



(S)-Alanina

[Acido (S)-(+)-2-amminopropanoico]

$[\alpha]_D = +8.5^\circ$

Proiezione a cunei e linee tratteggiate

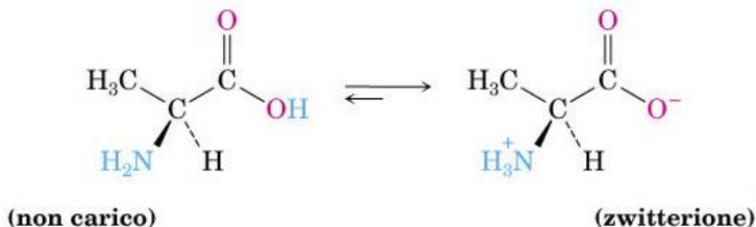
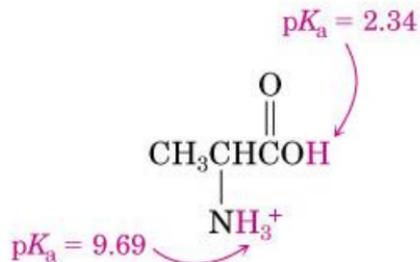
D-aminoacidi

Importanza terapeutica

D-Amino acid	Pharmaceuticals
D-Phenylglycine	Cefbuperazone, Cefpyramide, Aspoxycillin
D-Alanine	Alitame (L-Aspartil-D-Alanina dietanammide)
D-Valine	Fluvalinate, Penicillamine
D-Serine	Anti-cancer, anti-AIDS
D-Proline	N-carbobenzyloxy-D-Proline
D-Leucine	Anti-cancer, anti-AIDS
D-Glutamine	Romurtide, Abetimus, Murabutide
D-Glutamic acid	D-Glu-D-Trp
D-p-hydroxyphenylglycine	Cefbuperazone, Aspoxycilline

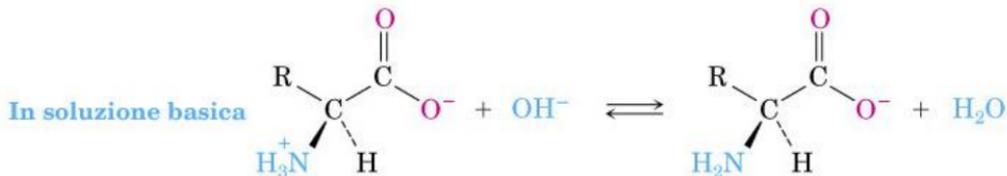
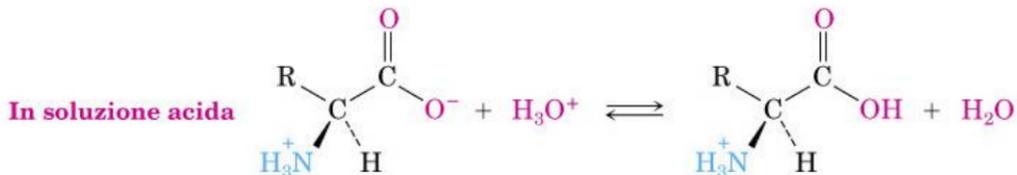
Gli amminoacidi hanno gruppi acidi e basici che formano sali interni: zwitterioni

Gruppo carbossilico più acido dell'acido acetico

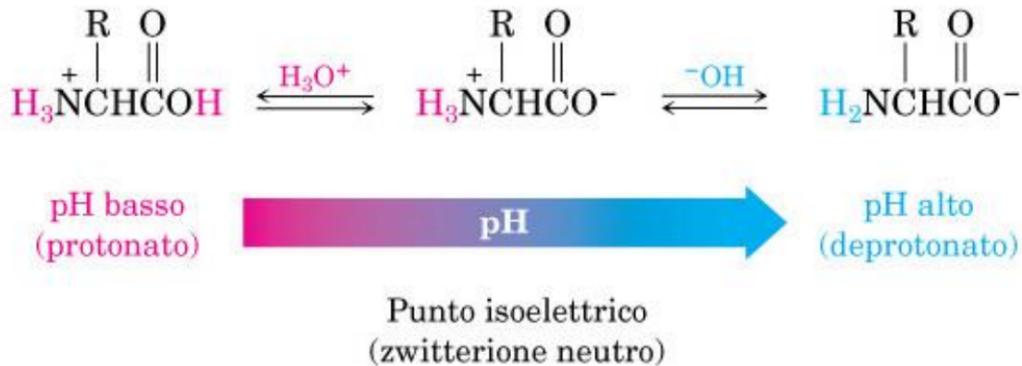


Alanina

Gli amminoacidi hanno proprietà sia acide che basiche

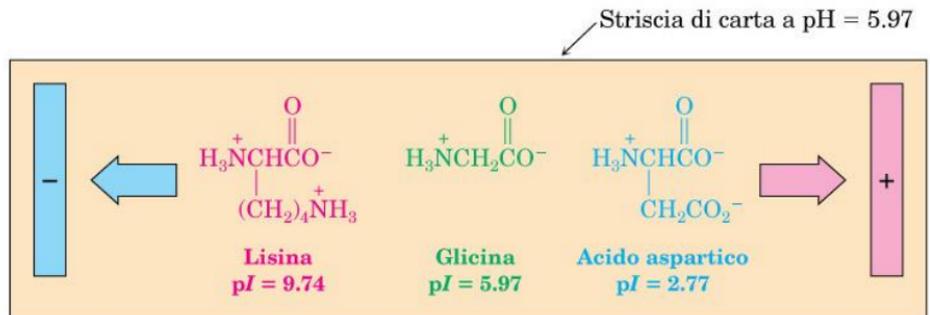


Il punto isoelettrico corrisponde al valore di pH al quale prevale la forma zwitterionica (globalmente neutra)



Al pH corrispondente al suo punto isoelettrico l'amminoacido non migra in un sistema elettroforetico

FIGURA 26.1 Separazione di una miscela di amminoacidi mediante elettroforesi. A $\text{pH} = 5.97$ le molecole di glicina sono per lo più neutre e non migrano, le molecole di lisina sono protonate e migrano verso l'elettrodo negativo e le molecole di acido aspartico sono deprotonate e migrano verso l'elettrodo positivo.



Come si determina sperimentalmente il pKa dei gruppi acidi e il punto isoelettrico: curva di titolazione acido-base

FIGURA 26.2 Curva di titolazione per l'alanina, ottenuta usando l'equazione di Henderson-Hasselbalch. Ognuno dei due tratti è tracciato separatamente. A $\text{pH} < 1$, l'alanina è completamente protonata; a $\text{pH} = 2.34$, l'alanina è una miscela 50:50 di forma protonata e neutra; a $\text{pH} = 6.01$, l'alanina è completamente neutra; a $\text{pH} = 9.69$, l'alanina è una miscela 50:50 di forme neutra e deprotonata; a $\text{pH} > 11.5$, l'alanina è completamente deprotonata.

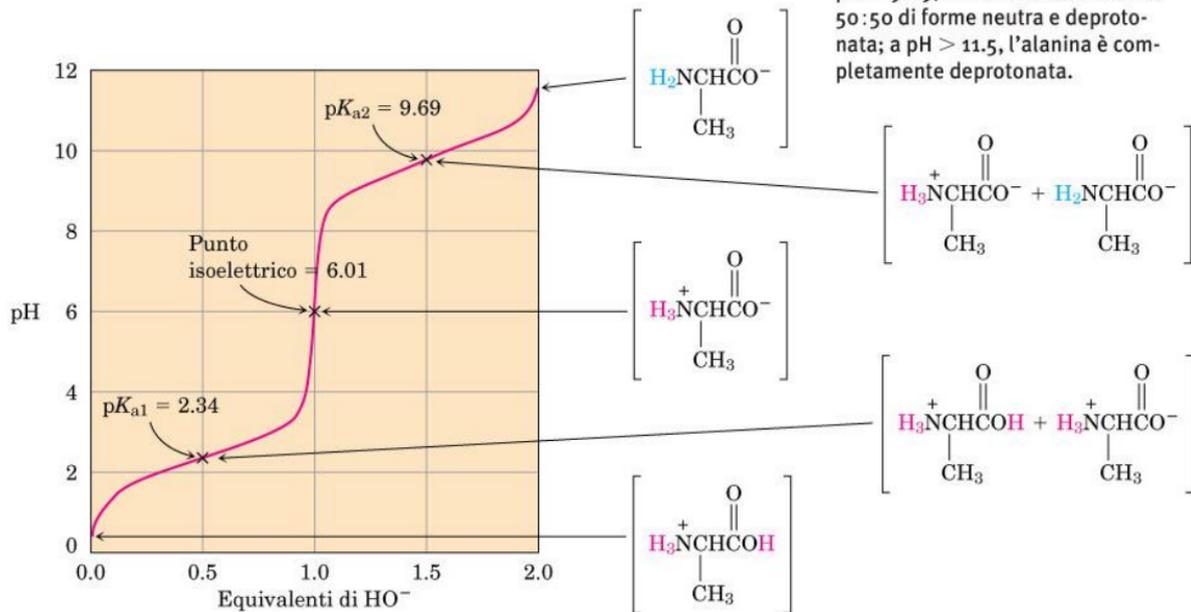
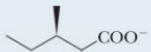
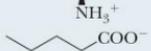
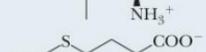
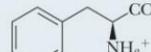
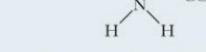
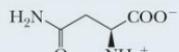
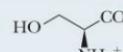
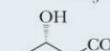
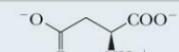
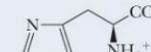
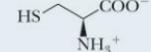
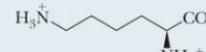
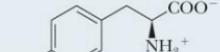


Tabella 27.1 | 20 amminoacidi comuni che si trovano nelle proteine

Catene laterali non polari	
	Alanina (Ala, A)
	Glicina (Gly, G)
	Isoleucina (Ile, I)
	Leucina (Leu, L)
	Metionina (Met, M)
	Fenilalanina (Phe, F)
	Prolina (Pro, P)
	Triptofano (Trp, W)
	Valina (Val, V)
Catene laterali polari	
	Asparagina (Asn, N)
	Glutammina (Gln, Q)
	Serina (Ser, S)
	Treonina (Thr, T)
Catene laterali acide	Catene laterali basiche
	
Acido aspartico (Asp, D)	Arginina (Arg, R)
	
Acido glutammico (Glu, E)	Istidina (His, H)
	
Cisteina (Cys, C)	Lisina (Lys, K)
	
Tirosina (Tyr, Y)	

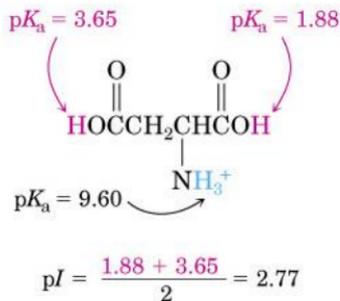
Alcuni amminoacidi hanno catene laterali dotate di reattività acida o basica

* Ciascun gruppo ionizzabile è riportato nella forma presente in maggior concentrazione a pH 7.0.

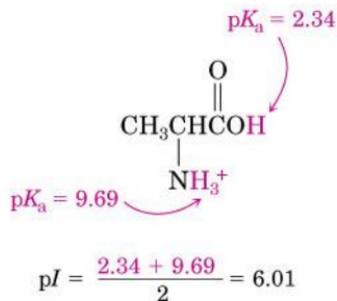
Amino Acid	Abbreviation		pK ₁	pK ₂	pK _R	pI
	3-Letters	1-Letter	-COOH	-NH ₃ ⁺	R group	
Alanine	Ala	A	2.34	9.69	-	6.00
Arginine	Arg	R	2.17	9.04	12.48	10.76
Asparagine	Asn	N	2.02	8.80	-	5.41
Aspartic Acid	Asp	D	1.88	9.60	3.65	2.77
Cysteine	Cys	C	1.96	10.128	8.18	5.07
Glutamic Acid	Glu	E	2.19	9.67	4.25	3.22
Glutamine	Gln	Q	2.17	9.13	-	5.65
Glycine	Gly	G	2.34	9.60	-	5.97
Histidine	His	H	1.82	9.17	6.00	7.59
Isoleucine	Ile	I	2.36	9.60	-	6.02
Leucine	Leu	L	2.36	9.60	-	5.98
Lysine	Lys	K	2.18	8.95	10.53	9.74
Methionine	Met	M	2.28	9.21	-	5.74
Phenylalanine	Phe	F	1.83	9.13	-	5.48
Proline	Pro	P	1.99	10.60	-	6.30
Serine	Ser	S	2.21	9.15	-	5.58
Threonine	Thr	T	2.09	9.10	-	5.60
Tryptophan	Trp	W	2.83	9.39	-	5.89
Tyrosine	Tyr	Y	2.20	9.11	10.07	5.66
Valine	Val	V	2.32	9.62	-	5.96

From Lehninger Principle of Biochemistry.

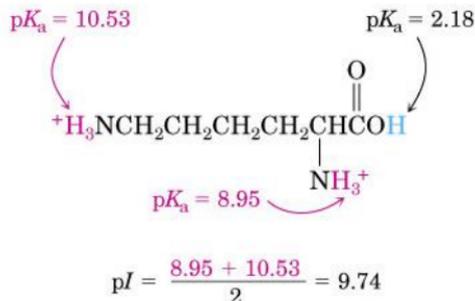
Alcuni amminoacidi presentano gruppi funzionali acidi o basici sulla catena laterale



Amminoacido acido
Acido aspartico



Amminoacido neutro
Alanina

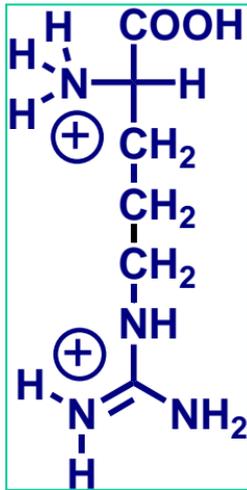


Amminoacido basico
Lisina

Gli a.a. acidi hanno un $pI < 5$

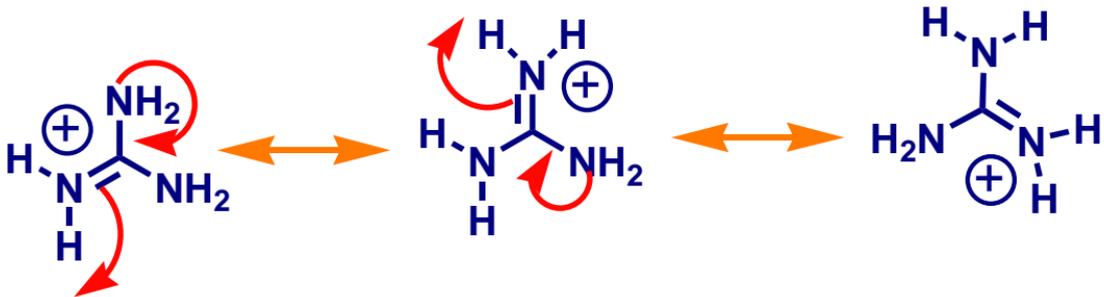
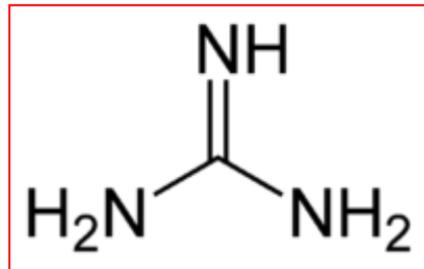
Gli a.a. basici hanno un $pI > 7$

Altri amminoacidi con catene laterali basiche



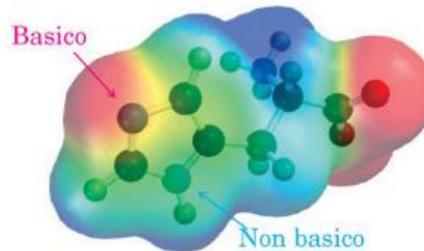
Arginina

pKa=12.5 (acido coniugato del gruppo guanidinico)



Amminoacidi con gruppi funzionali basici sulla catena laterale

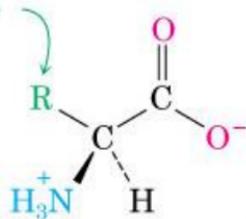
L'acido coniugato della
catena laterale ha $pK_a=6$



Istidina

La prolina è l'unico amminoacido dotato di gruppo alfa-amminico secondario

Catena laterale

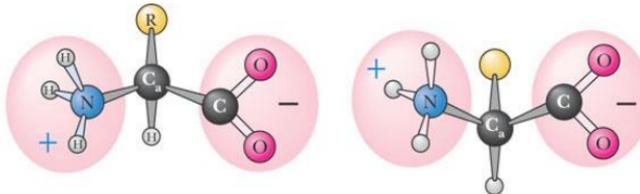


α -Amminoacido primario

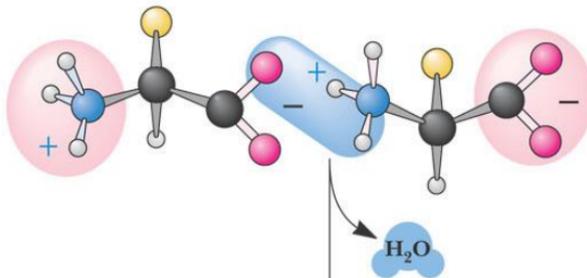


Prolina
(α -amminoacido secondario)

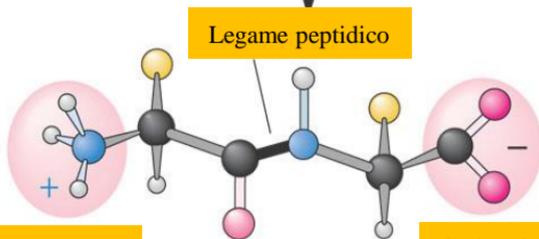
Il legame peptidico



Due amminoacidi



Eliminazione di acqua

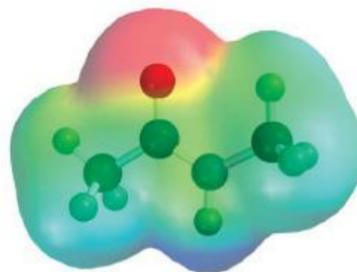
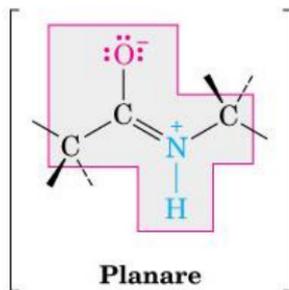
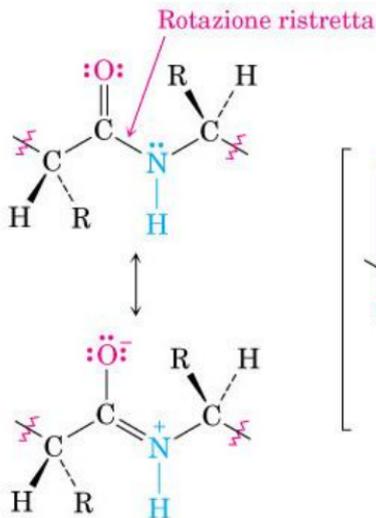


Formazione del
legame
peptidico/ammidico

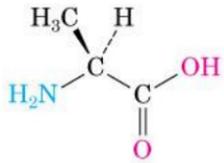
Ammino terminale

Carbossi-terminale

Risonanza del legame peptidico (ammidico)



Un di-peptide (Ala-Ser)

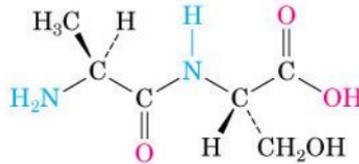


Alanina (Ala)

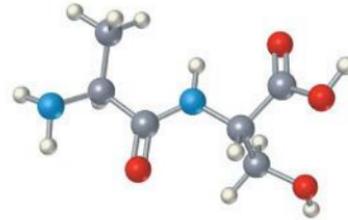
+



Serina (Ser)

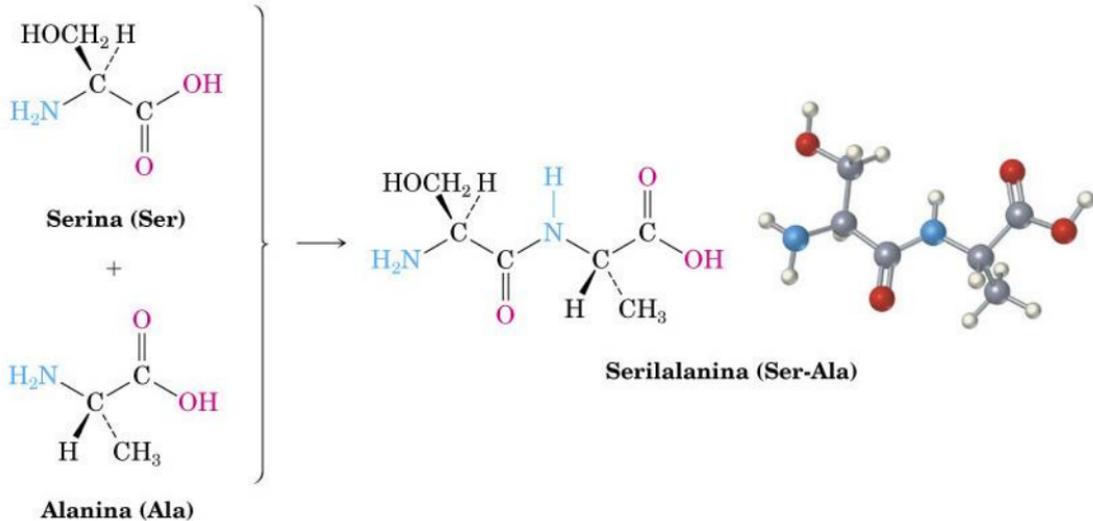


Alanilserina (Ala-Ser)

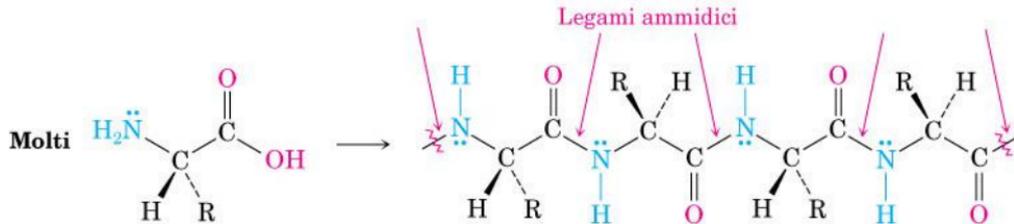


L'amminoacido terminale che ha il gruppo amminico libero è chiamato **N-terminale**, mentre quello con il gruppo carbossilico Libero è detto **C-terminale**. I peptidi sono nominati partendo dall'**N-terminale** è aggiungendo il suffisso **il** alla sigla dell' amminoacido corrispondente, tranne al C- terminale.

Un di-peptide (Ser-Ala)



Una catena peptidica



Peptide è un polimero di aminoacidi legati da legami di tipo Ammidico.

Una proteina ha un peso molecolare compreso tra 6000 e 40000000.

Peptidi e proteine

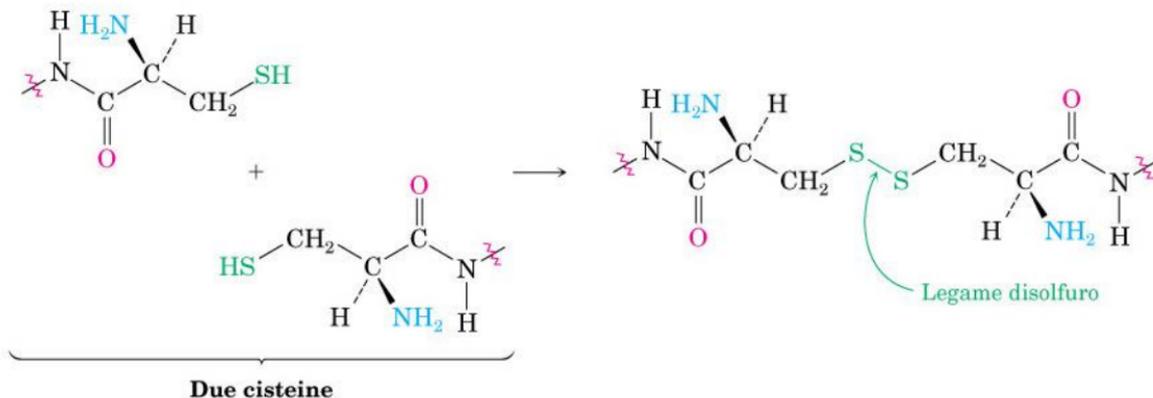
FUNZIONI:

- catalitiche → enzimi;
- trasporto di metaboliti ioni etc;
- ormonali → glucagone, insulina
- Recettoriali;
- Difensive → anticorpi;
- Contrattile;
- Strutturale → citoscheletro etc

Peptidi di interesse farmaceutico

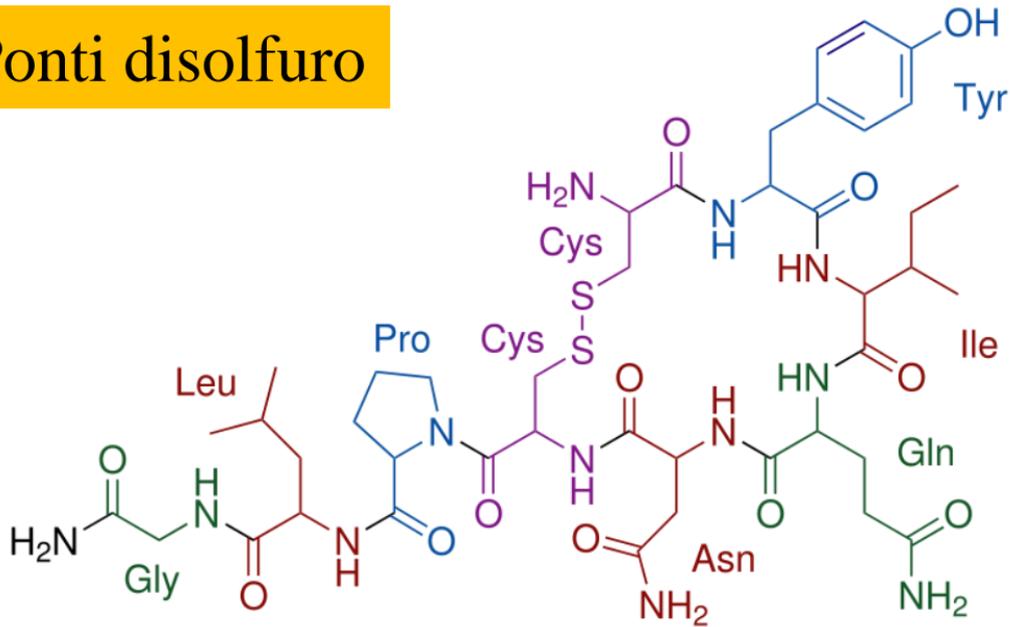
Polipeptide	Numero a.a.	P.M (g/mole)	Stato di produzione
Fuzeon	36	4492	approvato
Exendine	39	3369	III
Buserelin	9	1239,42	In commercio
Deslorelin	9	1282,45	In commercio
Goserelin	10	1269,41	In commercio
Leuprolide	9	1209,4	In commercio
Triptorelin	10	1734,96	In commercio
Ormone paratiroidale	34	9424,62	III
Pramlinitide	37		approvato
Somatostatina	14	1637,88	approvato
Lanretide	8	1096,33	approvato
Thymosine alpha-1	28	3108	approvato
Thymalfasin	28	3108	approvato
Salmon calcitonin	32	3431,81	In commercio
Terlipressin	12	1069,22	approvato
Desmopressin	9	1069,22	approvato
Zincotnotide	25		III

Oltre ai legami covalenti ammidici ci possono essere legami di tipo S-S tra due amminoacidi cisteina. Questi ponti si chiamano disolfuro. Sono questi ponti che vengono manipolati nel processo della permanente (capelli!).

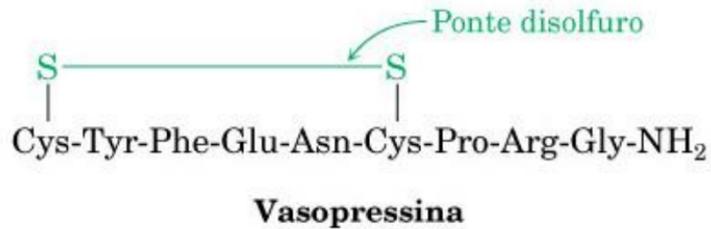


Ponti disolfuro

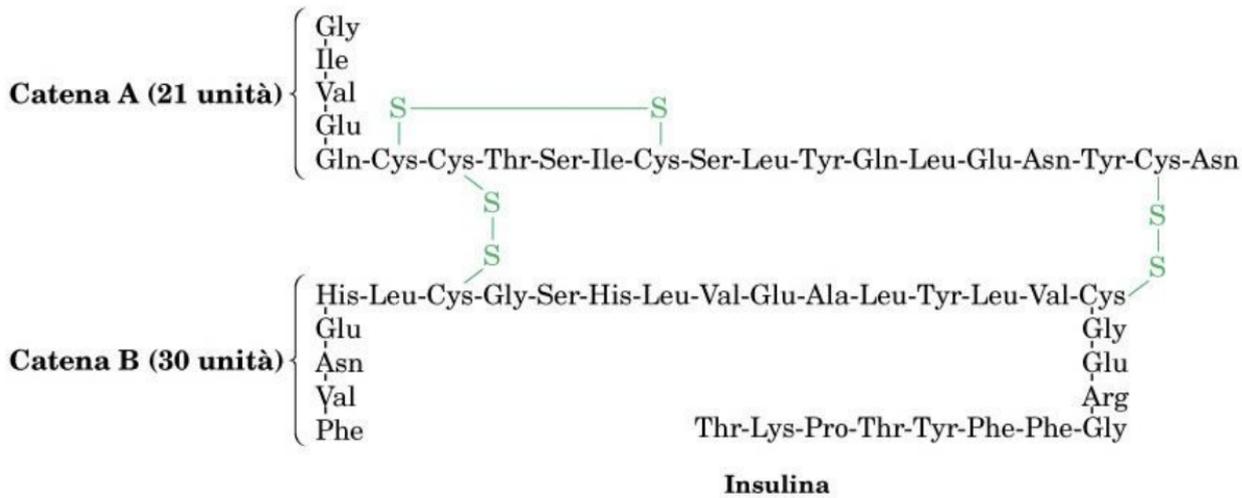
Ponti disolfuro



Struttura dell' ossitocina.

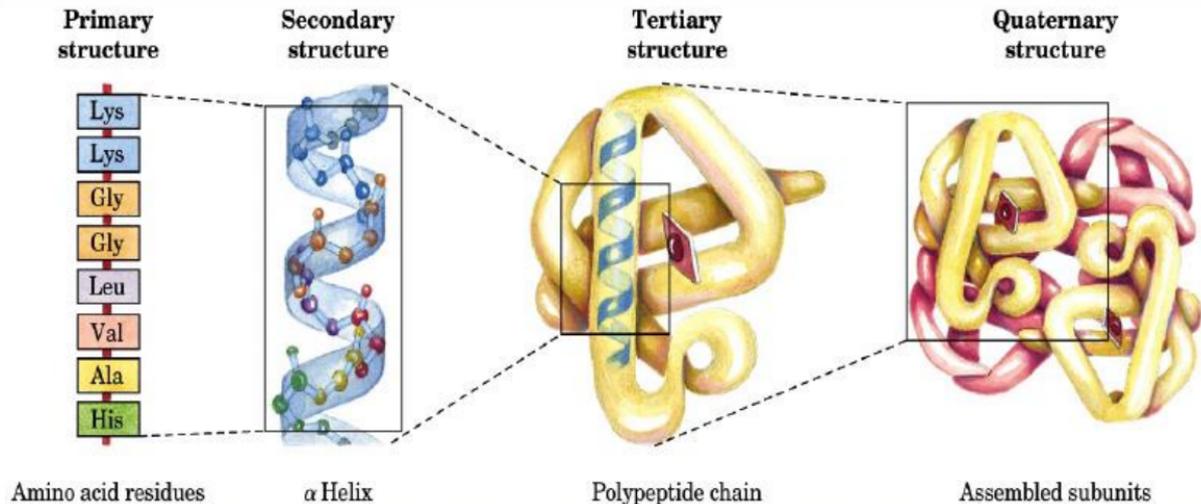


Ponti disolfuro



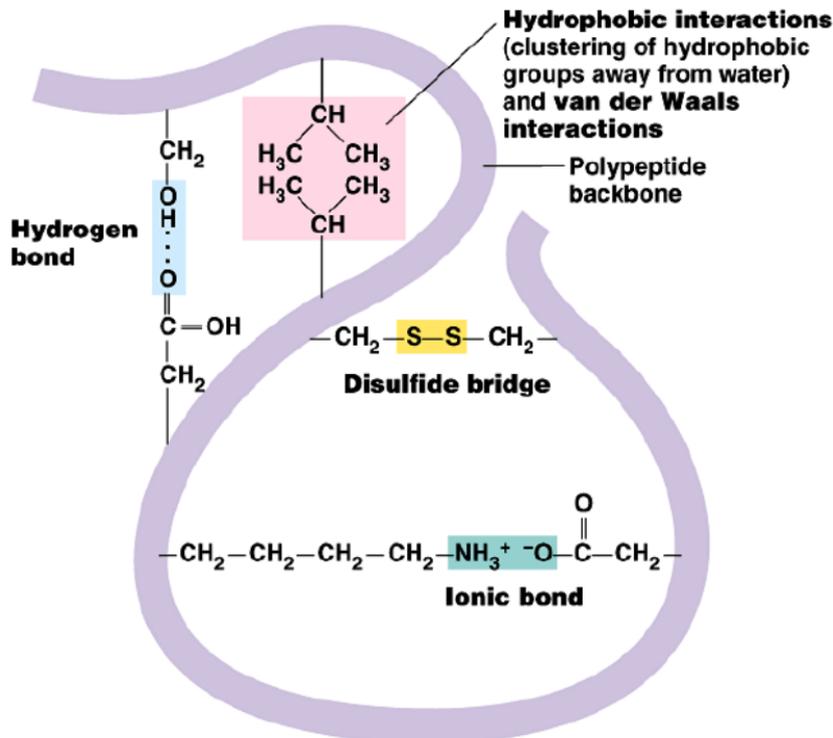
Ponti disolfuro

Struttura di una proteina



Proteine native= proteine nella loro conformazione funzionale termodinamicamente più stabile

La conformazione delle proteine viene determinata dall'instaurarsi di diversi tipi di interazioni elettrostatiche o legami ionici e covalenti

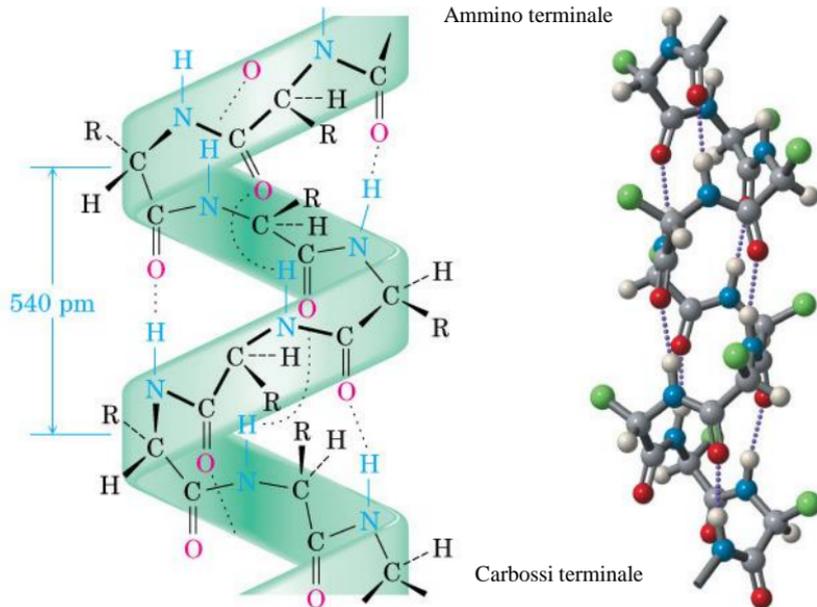


Struttura secondaria: α -elica

FIGURA 26.6 La struttura secondaria ad elica presente nell' α -cheratina.

Lo scheletro del polipeptide (ossia la sequenza di legami $C\alpha-C-N-C\alpha$ dei residui) risulta strettamente arrotolato attorno ad un asse centrale immaginario, mentre i gruppi laterali $-R$ dei residui amminoacidici sporgono radialmente all'esterno dell'elica.

Ogni giro completo dell'elica corrisponde ad una distanza di 540 pm lungo l'asse immaginario, il che implica che vengano coinvolti 3,6 amminoacidi ogni giro. Le α eliche possono essere destrorse o sinistrorse anche se le seconde rappresentano rare eccezioni.



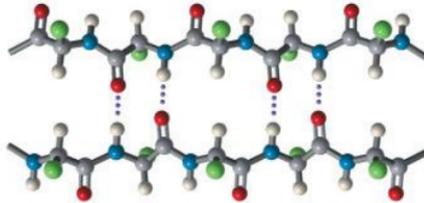
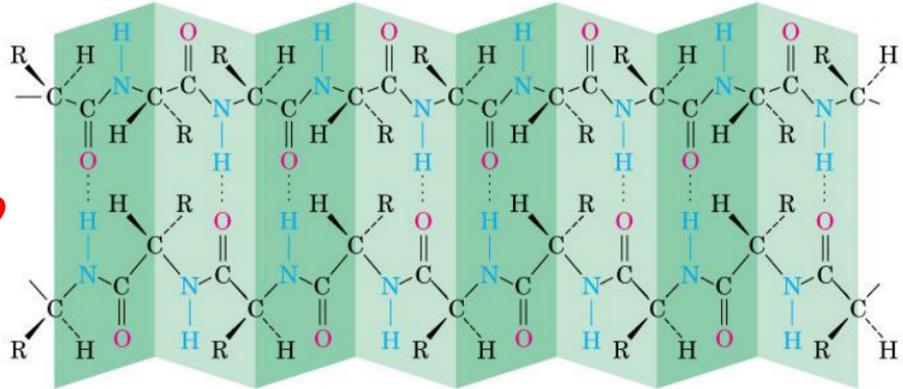
Struttura secondaria: foglietto- β

FIGURA 26.7 La struttura a foglietto β pieghettato nella fibroina della seta.

antiparallelo

Catena 1

Catena 2



Più *filamenti β* disposti uno accanto all'altro e collegati tra loro da tre o più legami idrogeno che formano una struttura planare molto compatta. Si definisce **filamento β** una sequenza peptidica di amminoacidi (tipicamente composta da 5-10 amminoacidi) che si dispone linearmente ed è in grado di instaurare legami idrogeno.

Struttura terziaria



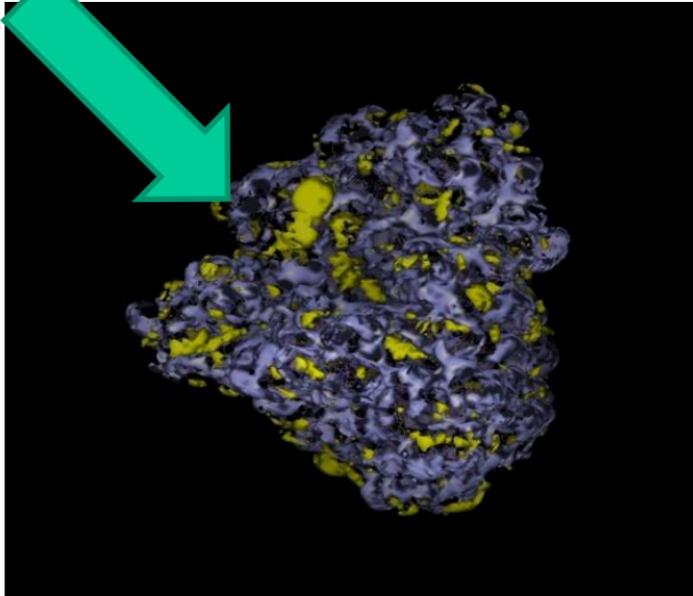
Simulazione al computer della struttura tridimensionale di un cristallo di una proteina globulare (lipasi, un enzima)

La superficie delle proteine globulari è idrofila perché esposta all'ambiente acquoso mentre l'interno ed il sito attivo sono maggiormente idrofobici

Apertura
del sito
attivo



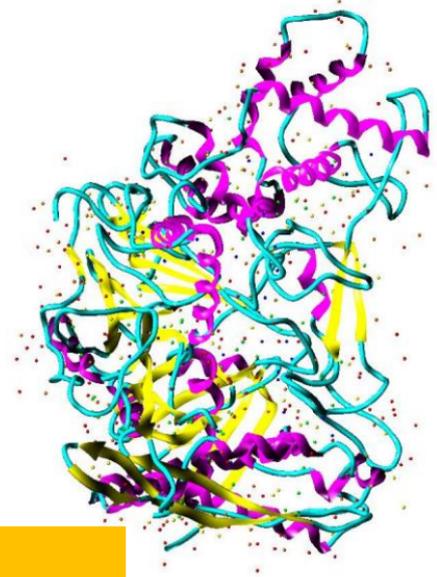
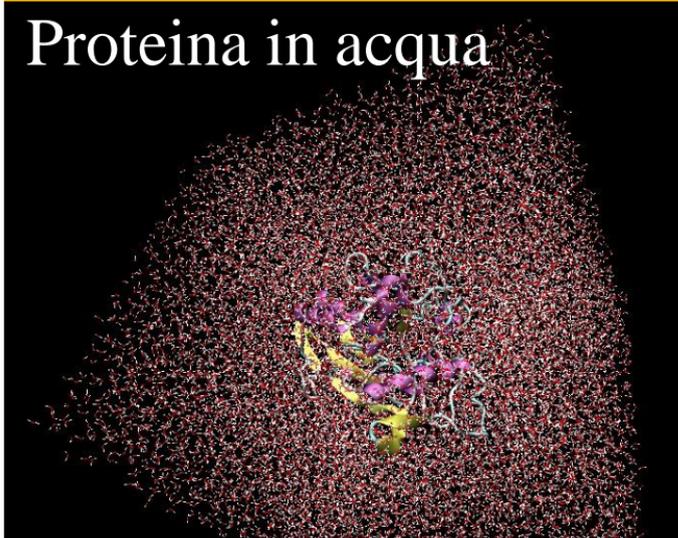
Aree idrofiliche



Penicillina G amidasi

La conformazione delle proteine dipende dall'ambiente esterno: la catena polipeptidica tende ad assumere la conformazione più stabile in funzione delle condizioni ambientali

Proteina in acqua



Simulazione al computer della struttura tridimensionale di un cristallo di una proteina: alcune molecole di acqua sono necessarie per il mantenimento della conformazione nativa

Enzimi in chimica farmaceutica

Utilizzati perché sono:

Regio-

Chemo-

Enantio-selettivi

Agiscono in condizioni blande

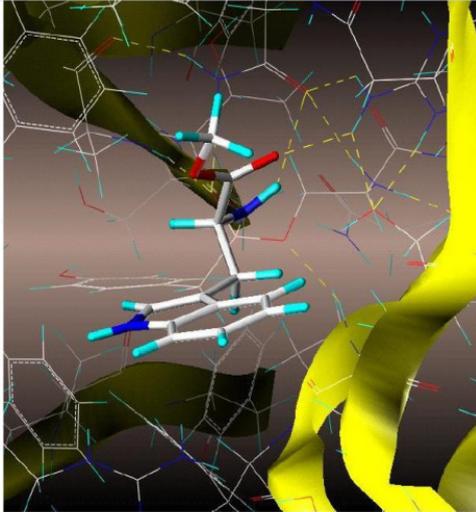
Sfruttamento dell'enantioselettività degli enzimi

Enzimi vengono applicati per risolvere miscele racemiche di farmaci o per operare “sintesi asimmetriche”

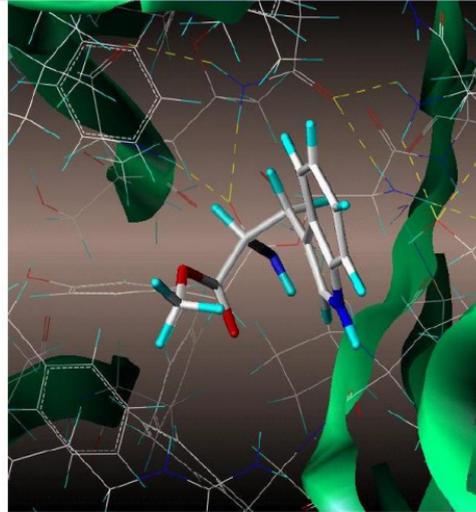
CHIRALITA' E FARMACI

- Dei nuovi farmaci immessi sul mercato tra il 2000 ed il 2004, il 56% è costituito da singoli enantiomeri.

I due enantiomeri vengono riconosciuti in maniera diversa: le interazioni con gli amminoacidi chirali del sito attivo determina diverse energie di legame



S-triptofano



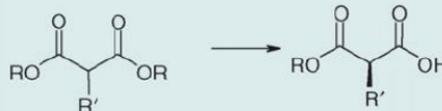
R-triptofano

L'enantiomero S stabilisce interazioni stabilizzanti (legami H)

L'enzima catalizza la trasformazione solo dell'enantiomero S

Esempi di reazioni enzimatiche usate per risolvere miscele racemiche

Hydrolysis (lipase/protease) [56,57]



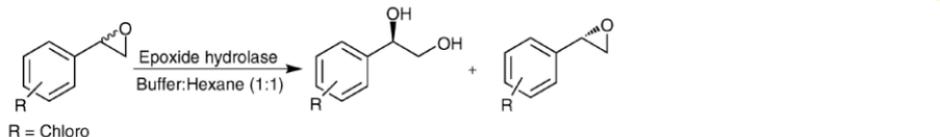
Ketone reduction (ketoreductase) [49–52,58]



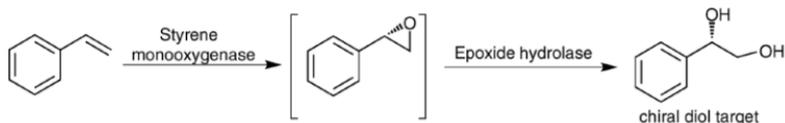
Nitrile reduction
(nitrilase) [59–62]



Cyanohydrin synthesis
(oxynitrilases) [63,64]

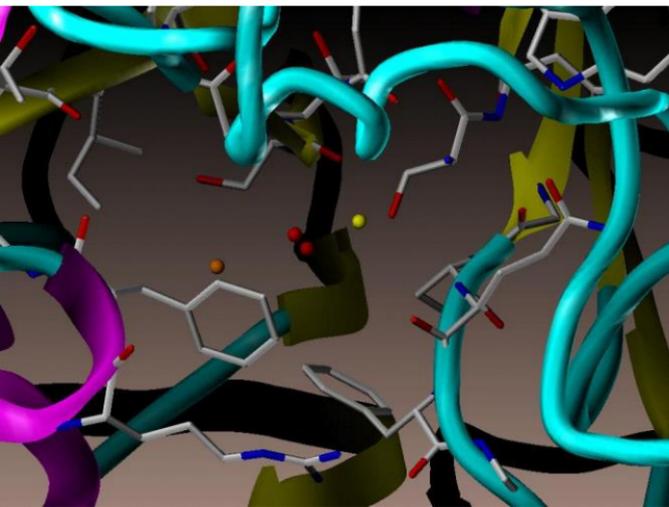


Scheme 6 Biocatalytic kinetic resolution of racemic 2-, 3-, and 4-chlorostyrene oxides using epoxide hydrolase.



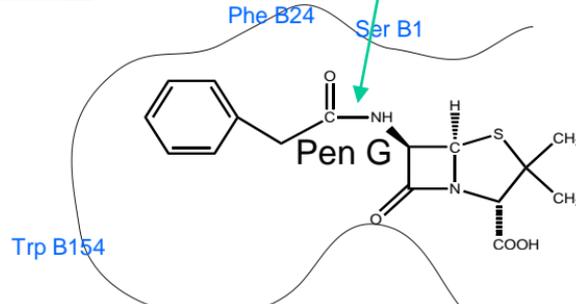
Scheme 7 Asymmetric dihydroxylation of an aryl olefin *via* a tandem monooxygenase and epoxide hydrolase biocatalysis approach.

Sfruttamento della regioselettività degli enzimi



Viene idrolizzato solo questo legame ammidico

Sito attivo:
riconosce la penicillina G
selettivamente



Il sito attivo degli enzimi è un ambiente di razione pre-organizzato che riconosce in maniera selettiva il substrato ed il gruppo funzionale che viene trasformato mediante catalisi

Idrolisi del legame peptidico:

Come tutti i legami ammidici anche il legame peptidico è scarsamente reattivo e viene idrolizzato solo in condizioni drastiche

idrolisi acida condotta

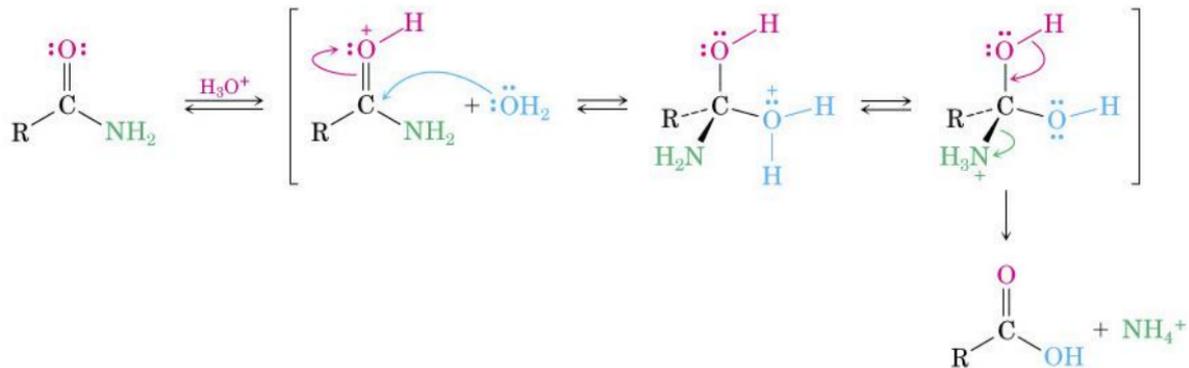
in soluzione acquosa

HCl 6M

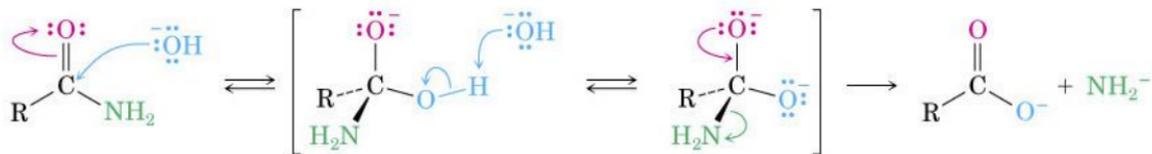
riscaldando

Idrolisi di ammidi/peptidi

Idrolisi acida



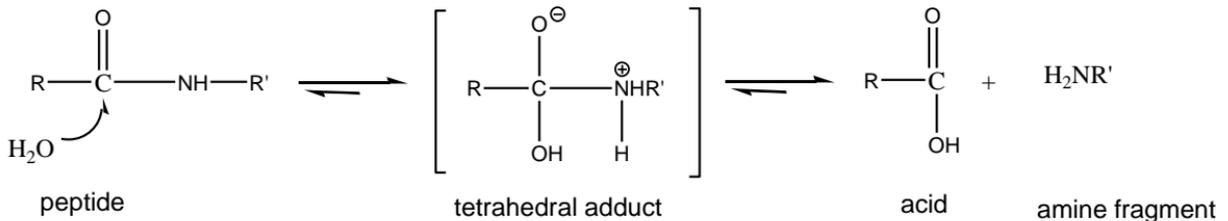
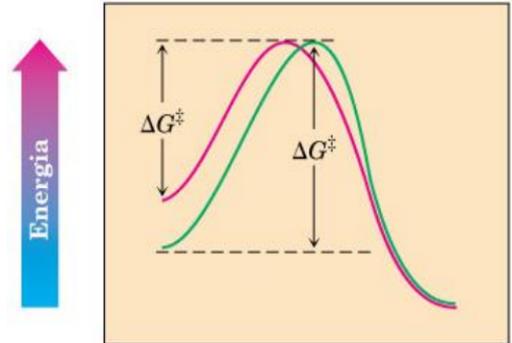
Idrolisi basica



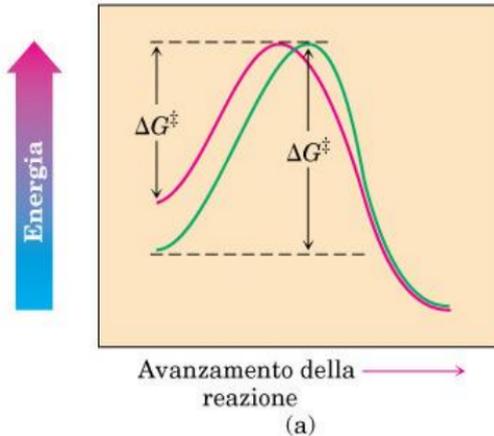
Perché una amidasi o peptidasi è in grado di idrolizzare il legame ammidico/peptidico a pH neutro?

In laboratorio devo usare:
HCl 6M, 100 °C , varie ore

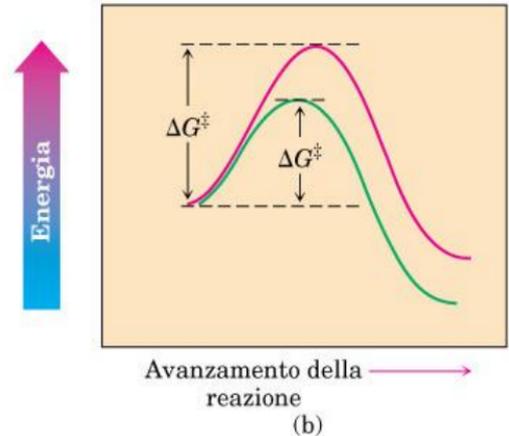
Quindi devo alzare l'energia del sistema usando condizioni molto drastiche. I reattivi sono dispersi in una soluzione acquosa



Come si può accelerare una reazione?

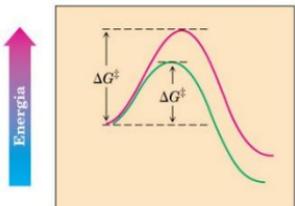
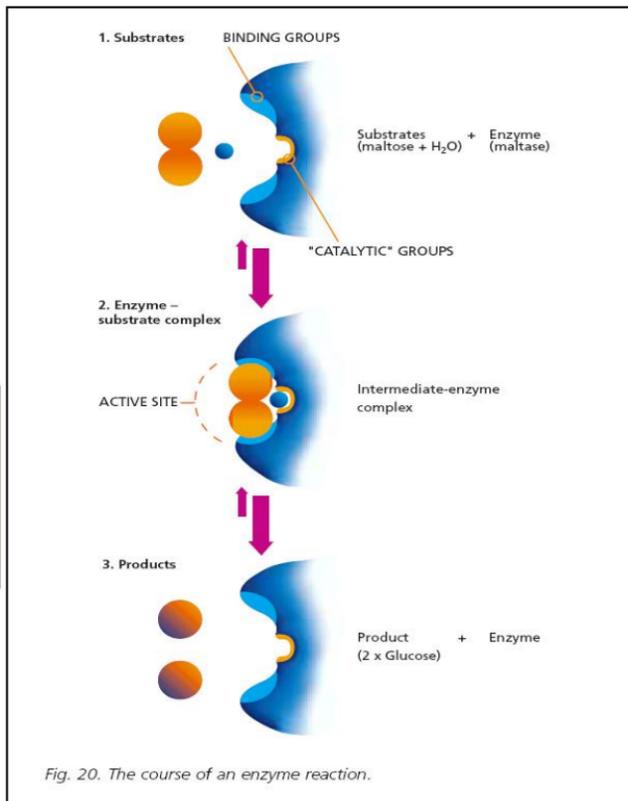


Aumento l'energia del sistema usando substrati molto reattivi



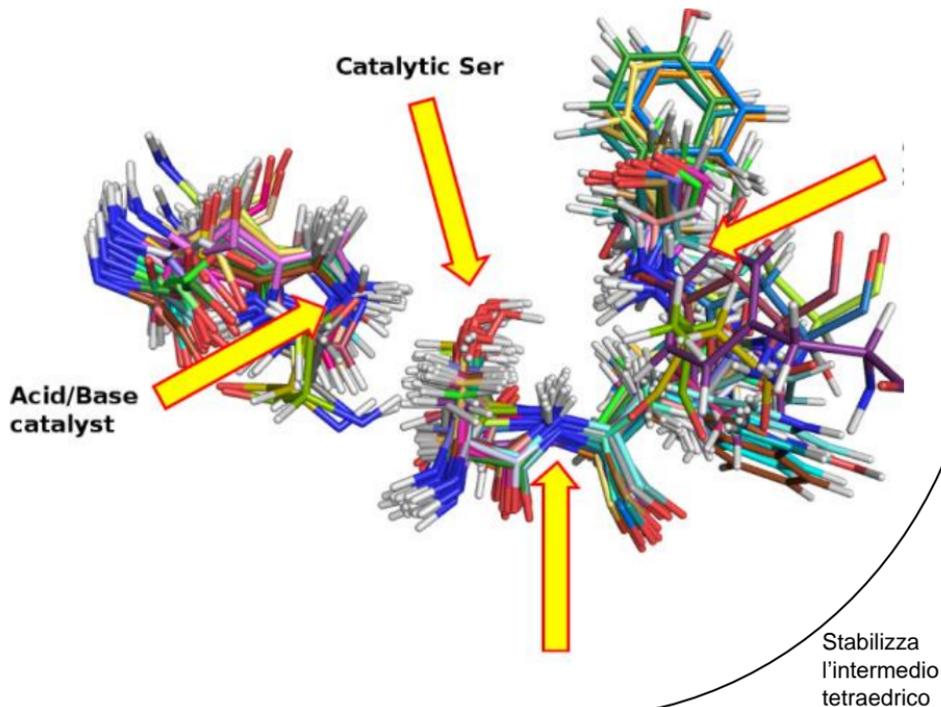
Stabilizzo lo stato di transizione abbassando l'energia di attivazione

L'enzima invece accoglie nel sito attivo i substrati e li fa interagire secondo una geometria già preorganizzata

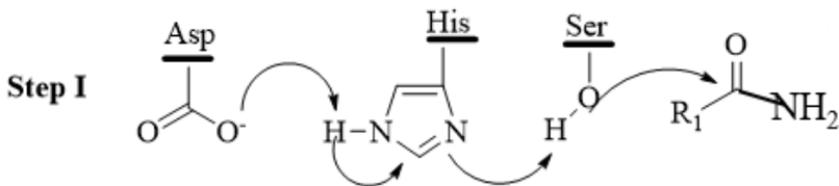


I gruppi funzionali del sito attivo dell'enzima stabilizzano lo stato di transizione e quindi l'accelerano

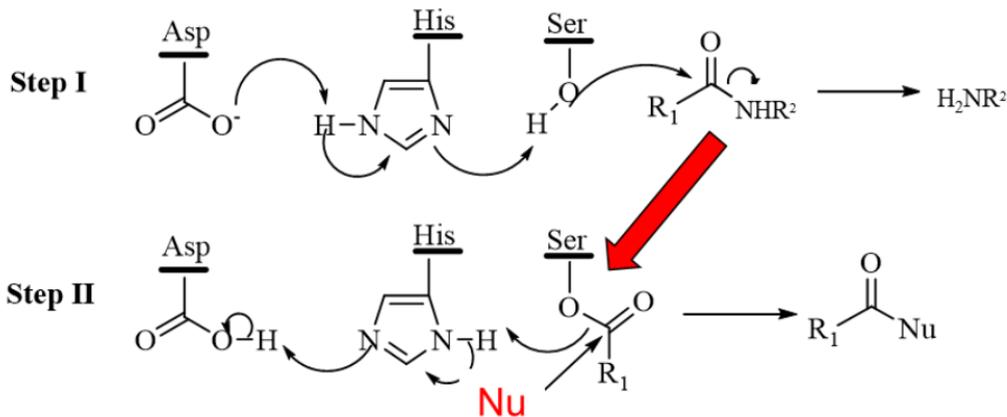
Strutture di 42 diverse idrolasi sovrapposte: l'organizzazione strutturale è simile



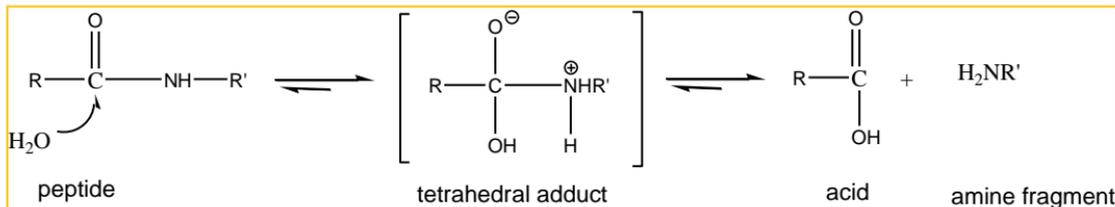
I gruppi funzionali acidi e basici delle catene laterali degli amminoacidi scambiano protoni (catalisi acida e basica). Viene attivata la nucleofilicità del gruppo alcolico di un serina che altrimenti sarebbe un nucleofilo molto debole



I gruppi funzionali acidi e basici delle catene laterali degli amminoacidi scambiano protoni (catalisi acida e basica). Viene attivata la nucleofilicità del gruppo alcolico di un serina che altrimenti sarebbe un nucleofilo molto debole



Acyl-enzyme intermediate



Enzymes allows reactions to take place at mild temperature and pH

Subtilisine from *Bacillus specie*:
digests proteins at 40°C and neutral pH
900 tons/y for additives in **detergents**

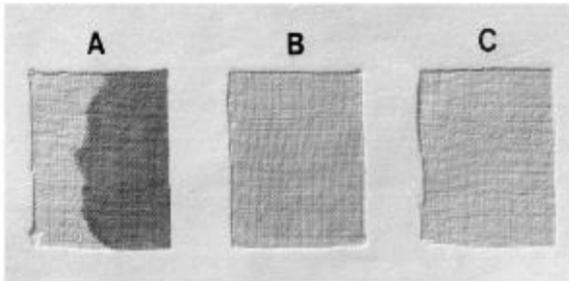
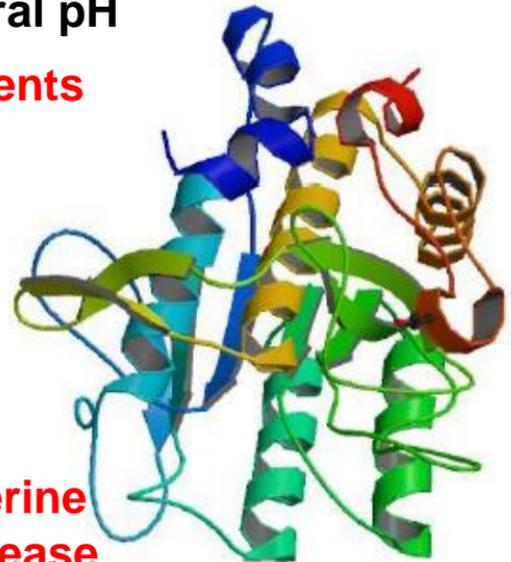


Fig. 6. Washing performance of alkaline protease from *B. brevis* in presence of detergent. (A, Cloth stained with blood; B, blood stained cloth washed with detergent only; and C, blood stained cloth washed with detergent and enzyme.)



**A serine
protease**

Also known as *Subtilisin Carlsberg*

Why traditions matter!

“Jacobson specifically wanted a laboratory that expanded science for the benefit of society,” Its charter declares that “the principal task of The Carlsberg Laboratory shall be to develop as complete a scientific basis as possible for malting, brewing and fermenting operations.” And on the wall of the building’s central grand staircase, the following mantra is inscribed in gold leaf: **“No result of the Laboratory’s activities which is of theoretical or practical importance shall be kept secret.”**



Carlsberg Foundation was founded in 1876 and owns 30.3% of the shares in [Carlsberg Group](#) and has 74.2% of the voting power.



A statue of company founder Jacobson. C. Carlsberg stands outside the Carlsberg Laboratory in Valby, Copenhagen.

LAURA CIPOLLA^{A,B}, LUCIA GARDOSI^{A,B,C}^ADIPARTIMENTO DI BIOTECNOLOGIE E BIOSCIENZE, UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO - BICOCCA^BDIRETTIVO DEL GRUPPO INTERDIVISIONALE PER LE BIOTECNOLOGIE DELLA SOCIETÀ CHIMICA ITALIANA^CDIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE E FARMACEUTICHE, UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE^{*}GARDOSI@UNITS.ITDOI: <http://dx.doi.org/10.17374/CI.2018.101.1.22>

523

reviews

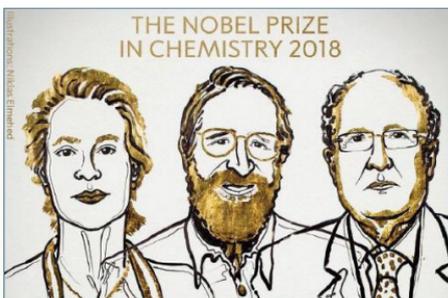
Directed evolution of enzyme catalysts

Olga Kuchner and Frances H. Arnold

Directed enzyme evolution has emerged in the past few years as a powerful alternative to rational approaches for engineering biocatalysts. Prerequisites for successful directed evolution are functional expression in a suitable microbial host, a rapid screen for the desired feature(s) and a well-thought-out working strategy for navigating protein landscapes. The rapidly growing body of literature on enzyme evolution in vitro includes techniques for creating and searching combinatorial enzyme libraries, as well as several successful examples of different evolutionary strategies being used.

IL NOBEL 2018 PREMIA L'EVOLUZIONE DELLA CHIMICA ATTRAVERSO LE BIOTECNOLOGIE

Il premio Nobel per la Chimica nel 2018 è andato agli scienziati che hanno sviluppato strumenti biotecnologici per accelerare e controllare in vitro l'evoluzione delle proteine. Queste metodologie, ideate da Arnold, Winter e Smith, hanno fornito biocatalizzatori di utilità pratica per l'industria chimica ma anche una nuova generazione di agenti terapeutici per cancro e malattie del sistema immunitario.



Frances H. Arnold

"for the directed evolution of enzymes"

George P. Smith

"for the phage display of peptides and antibodies"

Sir Gregory P. Winter

Chimica-Industria online

2018-2019

Chimica-Industria 100 ANNI

1 2019

La Chimica e l'Industria festeggia 100 anni!

HONOR. INSPIRE. CHALLENGE.

"Most innovations are not obvious to other people at the time. You have to believe in yourself. If you've got a good idea, follow it even when others say it's not."

– Frances Arnold
Directed Evolution of Enzymes
U.S. PATENT NO. 6,153,410

National Inventors Hall of Fame

Farmaci biotecnologici

la quota dei prodotti farmaceutici biotecnologici è passata dall'8% nel 2002 al 18 % nel 2014, comprendendo 7 dei 10 prodotti farmaceutici più venduti a livello mondiale. Ma questa considerazione può trovare ulteriore supporto, in termini più generali, dalle analisi dell'OECD le quali indicano che entro il 2025 un quarto della produzione chimica mondiale deriverà da processi biotecnologici o che comunque includono bio-risorse.

La rivoluzione della genomica e delle biotecnologie ha generato strumenti avanzati per sviluppare e produrre molecole in maniera mirata, efficace ed efficiente. La possibilità di sequenziare geni in maniera massiva viene ulteriormente potenziata dall'esistenza di potenti metodi bioinformatici e computazionali predittivi. Queste innovazioni offrono nuove opportunità alla chimica moderna per affrontare le pressanti sfide sociali ed ambientali attraverso una intima integrazione tra discipline un tempo considerate semplicemente complementari

[http://www.cefic.org/Documents/RESOURCES/PositionPapers/Bio Economy PositionPaper Cefic .pdf](http://www.cefic.org/Documents/RESOURCES/PositionPapers/Bio_Economy_PositionPaper_Cefic.pdf)

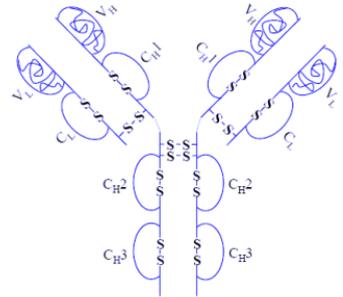
B –biotechnol * chyral
§ not chyral

Top drugs 2011-13

2011		2012		2013	
Rank	Drug	Rank	Drug	Rank	Drug
1	<i>Lipitor</i> *	1	Nexium *	1	Abilify §
2	<i>Plavix</i> *	2	Abilify §	2	Nexium *
3	Nexium *	3	Crestor *	3	Cymbalta *
4	Abilify §	4	Advair Diskus *	4	Humira B
5	Advair Diskus *	5	Cymbalta *	5	Crestor *
6	<i>Seroquel</i> B	6	Humira B	6	Advair Diskus *
7	<i>Singulair</i> *	7	Enbrel B	7	Enbrel B
8	Crestor *	8	Remicade B	8	Remicade B
9	Cymbalta *	9	Copaxone *	9	Copaxone *
10	Humira B	10	Neulasta B	10	Neulasta B

Humira

Adalimumab is a monoclonal antibody used to treat the symptoms and prevent the progression of active rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. It is used in children 2 years of age and older for juvenile idiopathic arthritis. This medicine is also used to treat psoriatic arthritis, which is a type of arthritis that causes pain and swelling



It binds to tumor necrosis factor-alpha (TNF α), which normally binds to TNF α receptors, leading to the inflammatory response of autoimmune diseases. By binding to TNF α , adalimumab reduces this inflammatory response. Because TNF α is also part of the immune system, which protects the body from infection, treatment with adalimumab may increase the risk of infections.

Humira costs approximately \$4370 per month (2017). From 2012 until the US patent expiry in 2016, Humira led the list of top-selling pharmaceutical products, and in 2016, it had \$16 billion of global sales. In 2014, in India, the first adalimumab biosimilar came to market at a price of \$200.

George Smith ha sviluppato una tecnica di laboratorio chiamata *“Phage display”* in cui un batteriofago (un virus che infetta batteri) può essere usato per produrre in grandi quantità nuove proteine, tra cui anticorpi e enzimi, e peptidi utilizzabili in vari ambiti tra cui la medicina (medicina trasfusionale, trattamento delle patologie autoimmuni, neurodegenerative, tumorali) .

Il gene che codifica per la proteina o il peptide di interesse viene inserito nella capsula di rivestimento del fago. Il DNA del fago è poi inserito in un batterio che produce fagi e che finisce con l'espore, all'esterno, la proteina o il peptide desiderato. La molecola così esposta esternamente può essere utilizzata per studiare l'interazione specifica con acidi nucleici, piccole molecole o altre proteine, quali anticorpi specifici.

Gregory Paul Winter, co-fondatore dell'azienda biotecnologica Cambridge Antibody Technology ha sfruttato la tecnica messa a punto da Smith per produrre anticorpi con attività specifiche applicabili in campo medico e farmaceutico. La tecnica di Winter ha permesso di produrre, tra gli altri, un anticorpo contro la proteina chiamata TNF- α (Tumor Necrosis Factor), che gioca un ruolo in molte malattie. Queste ricerche hanno portato alla produzione dell'anticorpo **Adalimumab (Humira®)**, il primo anticorpo monoclonale approvato per uso clinico nel 2002 e usato per il trattamento dell'artrite reumatoide, la psoriasi, il morbo di Crohn e la colite ulcerosa. Le sue vendite hanno raggiunto i 18 miliardi di \$.

MAKING ANTIBODIES BY PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY

Greg Winter^{1,2}, Andrew D. Griffiths¹, Robert E. Hawkins¹, and Hennie R. Hoogenboom³

¹MRC Centre for Protein Engineering and ²MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK; ³Cambridge Antibody Technology, The Science Park, Melbourn, Cambridgeshire

KEY WORDS: selection, repertoires, rearranged V-genes, V-gene segments, polymerase chain reaction

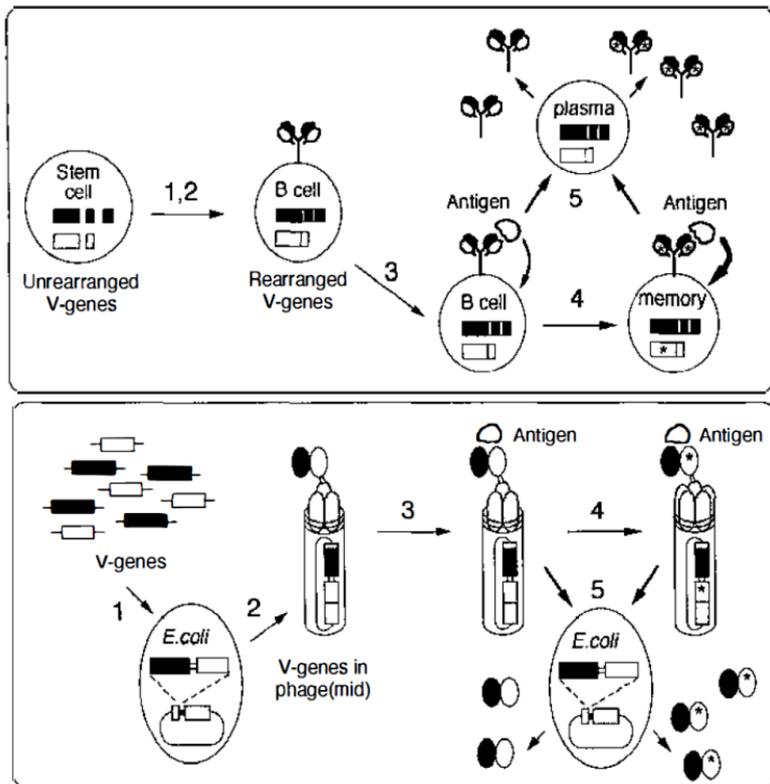


Figure 1 Generation of antibodies by the immune system and phage technology. Steps: (1) rearrangement or assembly of germline V genes; (2) surface display of antibody (fragment); (3) antigen-driven or affinity selection; (4) affinity maturation; (5) production of soluble antibody (fragment).

Nome del prodotto biotecnologico	Nome commerciale	Target	Forma anticorpale	Società	Approvazione FDA	Indicazione terapeutica
Adalimumab	Humira	Tumor necrosis factor (TNF)	IgG	AbbVie	2002	Artrite reumatoide
Belimumab	Benlysta	B-lymphocyte stimulator	IgG	GSK	2011	Lupus erythematosus
Necitumumab	Portrazza	Epidermal growth factor receptor	IgG	ImClone / Lilly	2015	Carcinoma del polmone a cellule squamose
Ramucirumab	Cyramza	Vascular endothelial growth factor receptor	IgG	ImClone / Lilly	2014	Cancro dello stomaco e del colon retto, carcinoma del polmone a cellule squamose
Ranibizumab	Lucentis	Vascular endothelial growth factor A	Fab	Genentech	2006	Degenerazione maculare
Raxibacumab	Abthrax	Protective antigen	IgG	GSK	2012	Antrace

La Tabella mostra i primi 6 anticorpi monoclonali approvati per uso clinico ottenuti tramite la tecnologia del phage display, ma esistono almeno altri **60 candidati** che sono attualmente oggetto di test clinici. Complessivamente gli anticorpi monoclonali sono il segmento del mercato delle proteine terapeutiche che sta crescendo maggiormente, essendoci ormai più di 50 anticorpi approvati per uso clinico che hanno generato profitti di circa 75 miliardi di \$ nel 2013.

La tecnologia del “*Phage display*” non solo consente la generazione di sequenze di anticorpi interamente umani, ma, basandosi sulla selezione di affinità *in vitro* che avviene in un ambiente completamente controllabile, può anche superare alcune limitazioni tipiche del sistema immunitario.

Ad esempio, **si possono ottenere anticorpi che riconoscono molecole molto piccole o non immunogeniche** e che non potrebbero essere ottenuti con le classiche procedure di immunizzazione. Inoltre, durante il processo di selezione dell'anticorpo **si può controllare il profilo di specificità** di un anticorpo in maniera molto mirata, escludendo una reattività crociata indesiderata oppure favorendo il riconoscimento di una specifica conformazione dell'antigene.

Attualmente la tecnica del *phage display* trova una vasta gamma di applicazioni che vanno oltre all'uso terapeutico, e che comprendono lo viluppo di anticorpi catalitici ma anche vaccini.