



Biotechnologie applicate

TRANSACTIVA⁺
MOLECULAR
FARMING
sustainable biologics

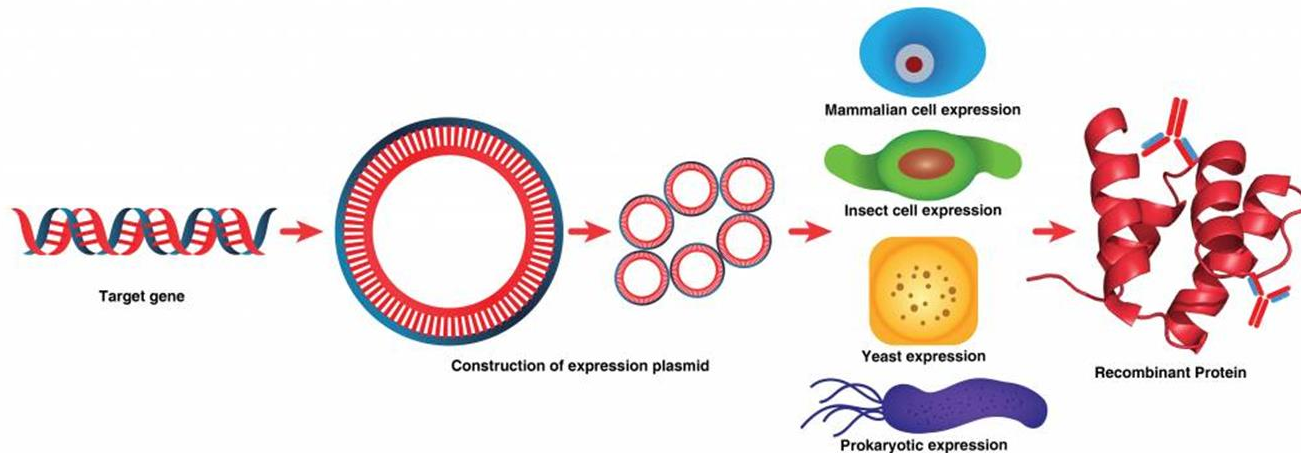
PLANT MOLECULAR FARMING: MOLECULAR BIOLOGY OVERVIEW

Caterina Deganutti, PhD
info@transactiva.it



BIOLOGIA MOLECOLARE

«La biologia molecolare è la branca della biologia che studia gli esseri viventi a livello dei meccanismi molecolari alla base della loro fisiologia, concentrandosi in particolare sulle interazioni tra le macromolecole, ovvero proteine e acidi nucleici (DNA e RNA). In biologia molecolare si utilizzano tecniche sperimentali che consentono la rilevazione, l'analisi, la manipolazione, l'amplificazione (PCR) e la copia (clonaggio) degli acidi nucleici.»



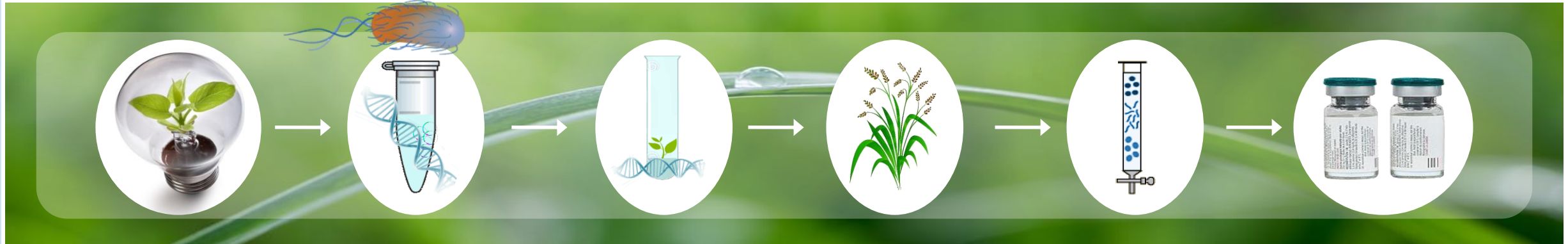
ASPETTATIVA



REALTÀ



PLANT MOLECULAR FARMING



↓
IDEA

↓
DNA
MANIPULATION

↓
PLANT
MODIFICATION

↓
PLANT
GROWTH

↓
PROTEIN
EXTRACTION

↓
FINAL
PRODUCT

UP-STREAM

**TARGET
EXPRESSION**

DOWN-STREAM



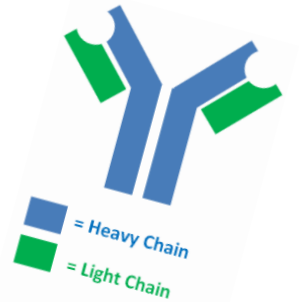
DALL'IDEA ALLA REALIZZAZIONE



- Una volta decisa la proteina terapeutica che voglio esprimere, devo sapere:
- SEQUENZA AMINOACIDICA
 - QUANTE CATENE AMINOACIDICHE COMPONGONO LA PROTEINA (eg per anticorpi catena leggera e catena pesante)
 - SE DISPONIBILE; DNA ORGANISMO DI PARTENZA
 - FOLDING DELLA PROTEINA → RICHIEDE MODIFICHE POSTRADUZIONALI?
 - PRESENZA DI GLICOSILAZIONE?
 - DOVE VOGLIO CHE L'HOST (nel nostro caso, la pianta) MANDI LA PROTEINA?
 - CI SONO GIÀ GRUPPI DI RICERCA CHE HANNO LAVORATO SU QUESTA PROTEINA? CON QUALI RISULTATI?
 - VARIE

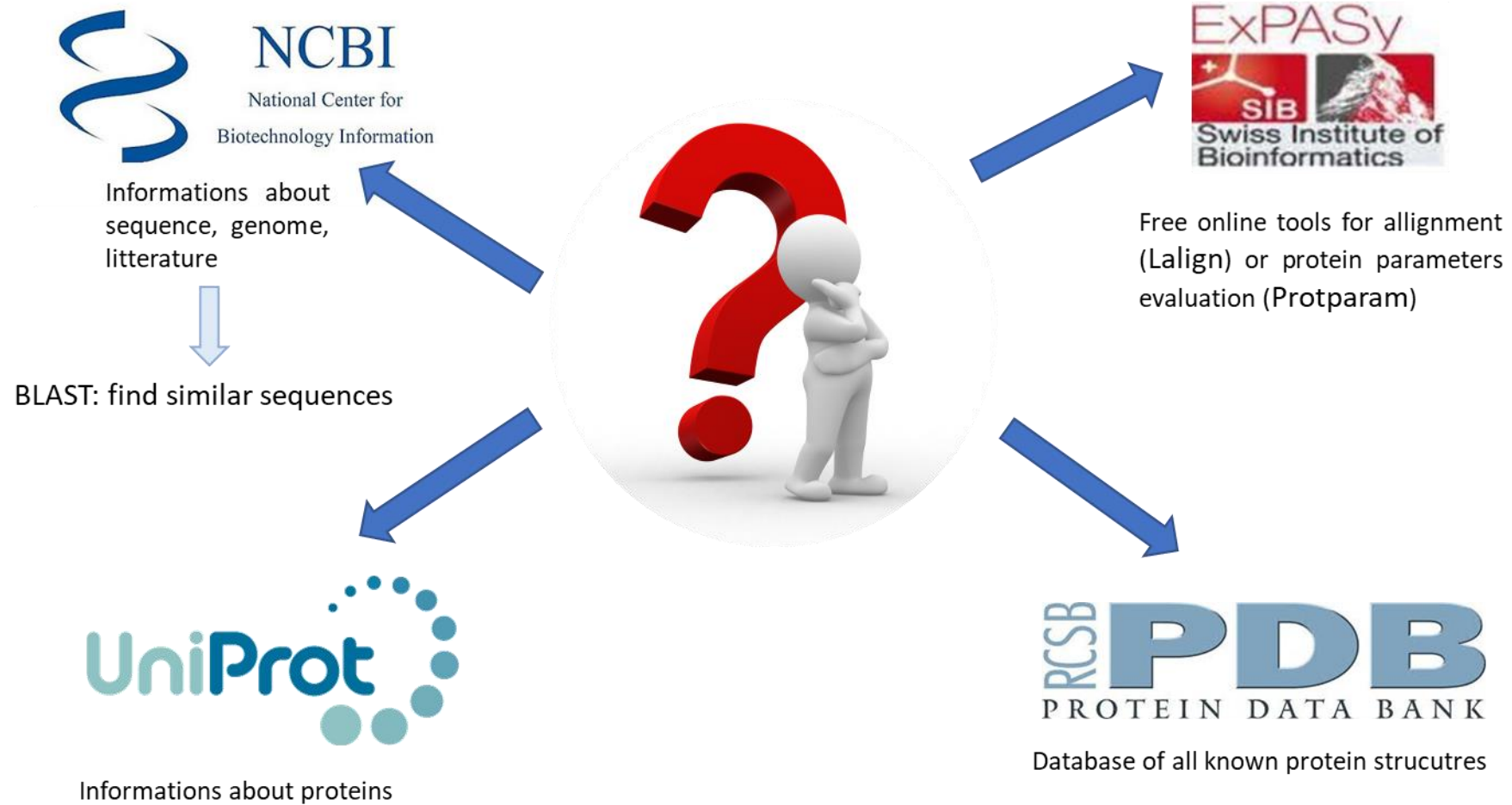


CARTA DI IDENTITÀ DELLA MIA PROTEINA



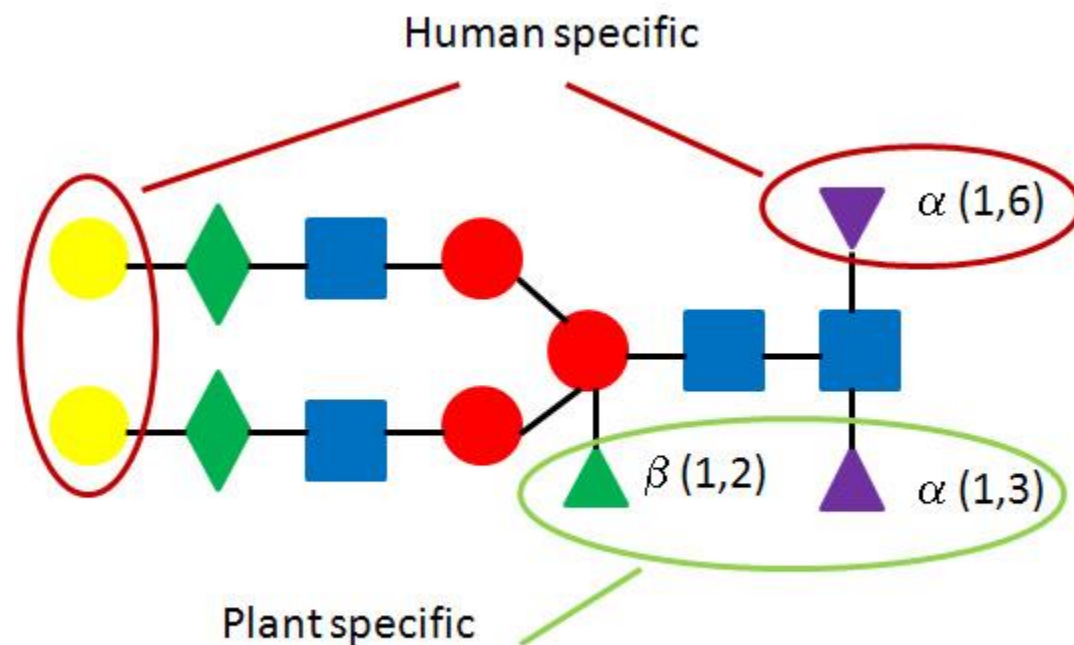
DALL'IDEA ALLA REALIZZAZIONE

Fonti di informazioni



DALL'IDEA ALLA REALIZZAZIONE

La glicosilazione



Le piante inseriscono zuccheri diversi:

- Sito di glicosilazione comune (Asn) Asn-X-Ser/Thr
- beta(1,2)-xylose
- core alpha(1,3)-fucose
- Assenza acido sialico terminale

Questi zuccheri sono in grado di attivare il sistema immunitario umano e possono essere causa di forti reazioni allergiche.

VANTAGGIO
vaccini

SVANTAGGIO
enzimi



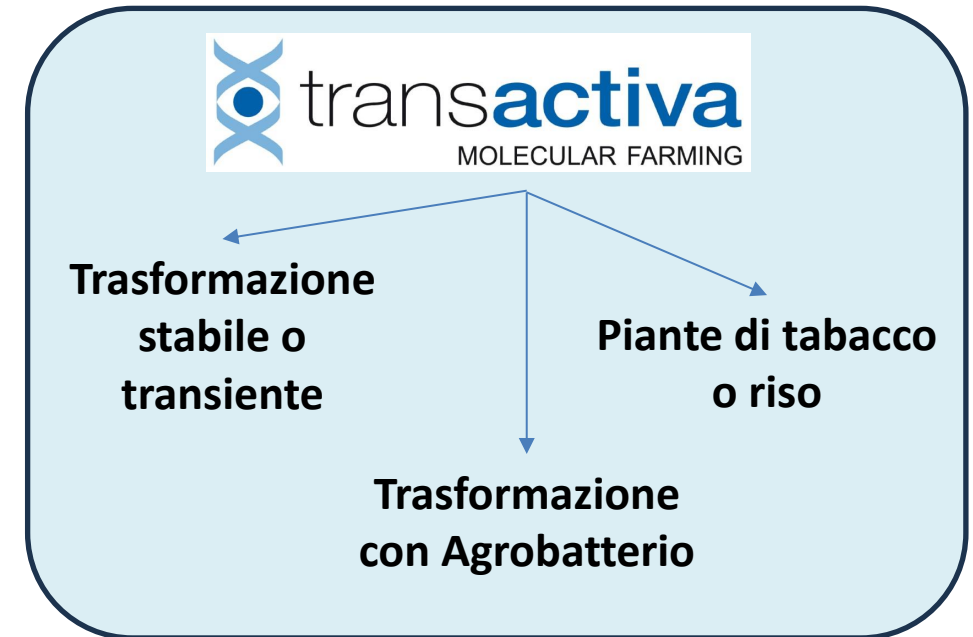
PLANT MOLECULAR FARMING

Tecniche di trasformazione

Molte piante



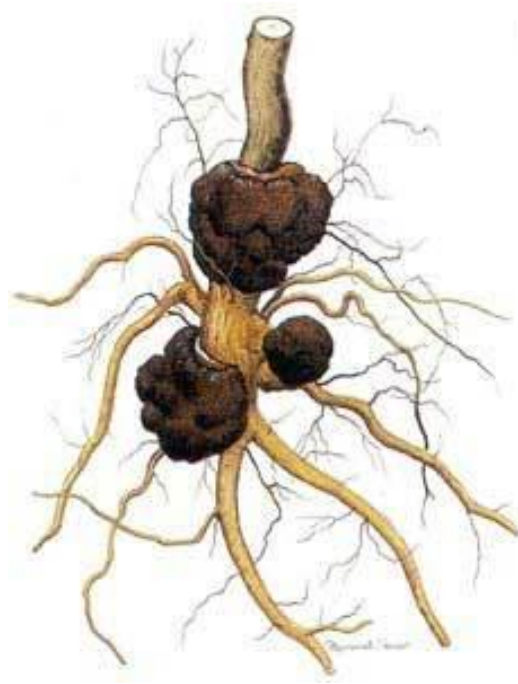
Diverse tecniche di trasformazione



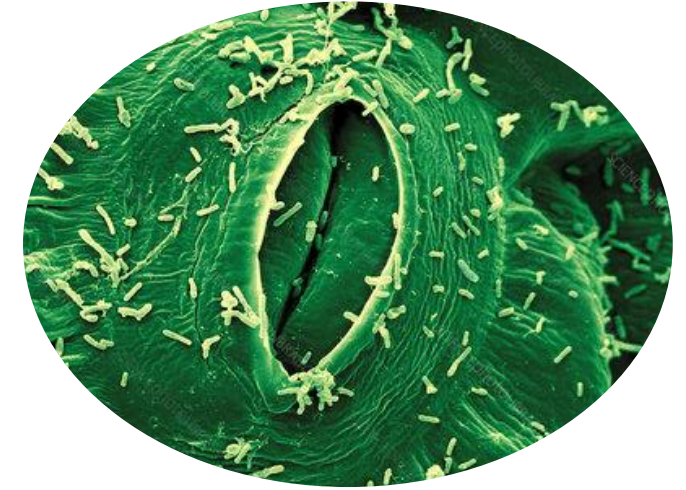
L'AGROBATTERIO IN NATURA



Agrobacterium tumefaciens è un batterio aerobo GRAM -, facente parte della famiglia delle Rhizobiaceae (cui appartengono molti simbionti azotofissatori delle piante).
Ha la particolarità di possedere il Ti plasmid per l'infezione delle piante.



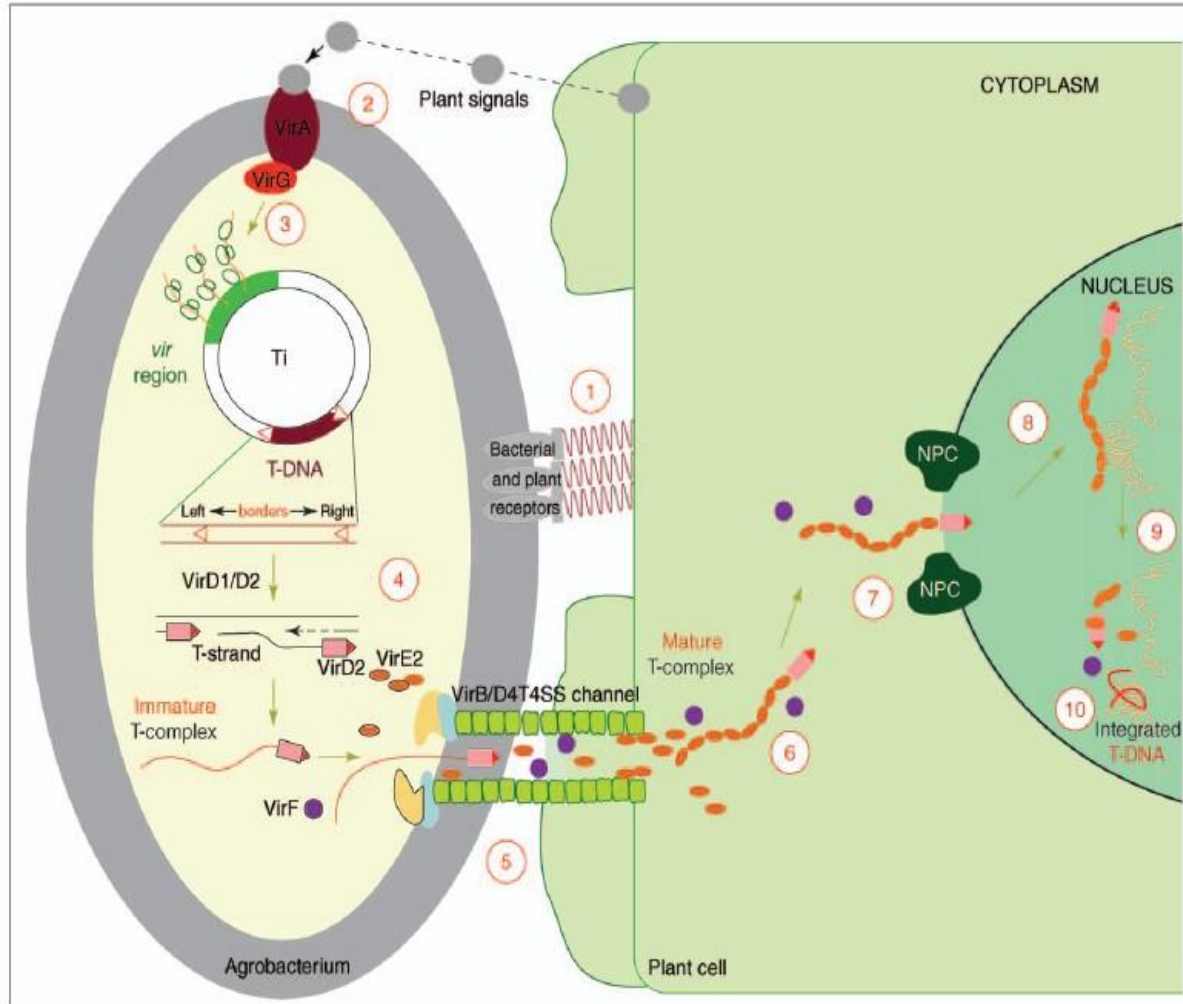
È in grado di indurre la formazione di tumori nella zona d'infezione della pianta (tra fusto e radici). Questi tumori vengono definiti «GALLA DEL COLLETTO».



In natura, *A. tumefaciens* attacca i tessuti della pianta tramite lesioni pre-esistenti. Quindi trasferisce il suo Ti DNA nel genoma della pianta, che è così indotta a produrre sostanze utili alla proliferazione del batterio. Ha una predilezione per le dicotiledoni.



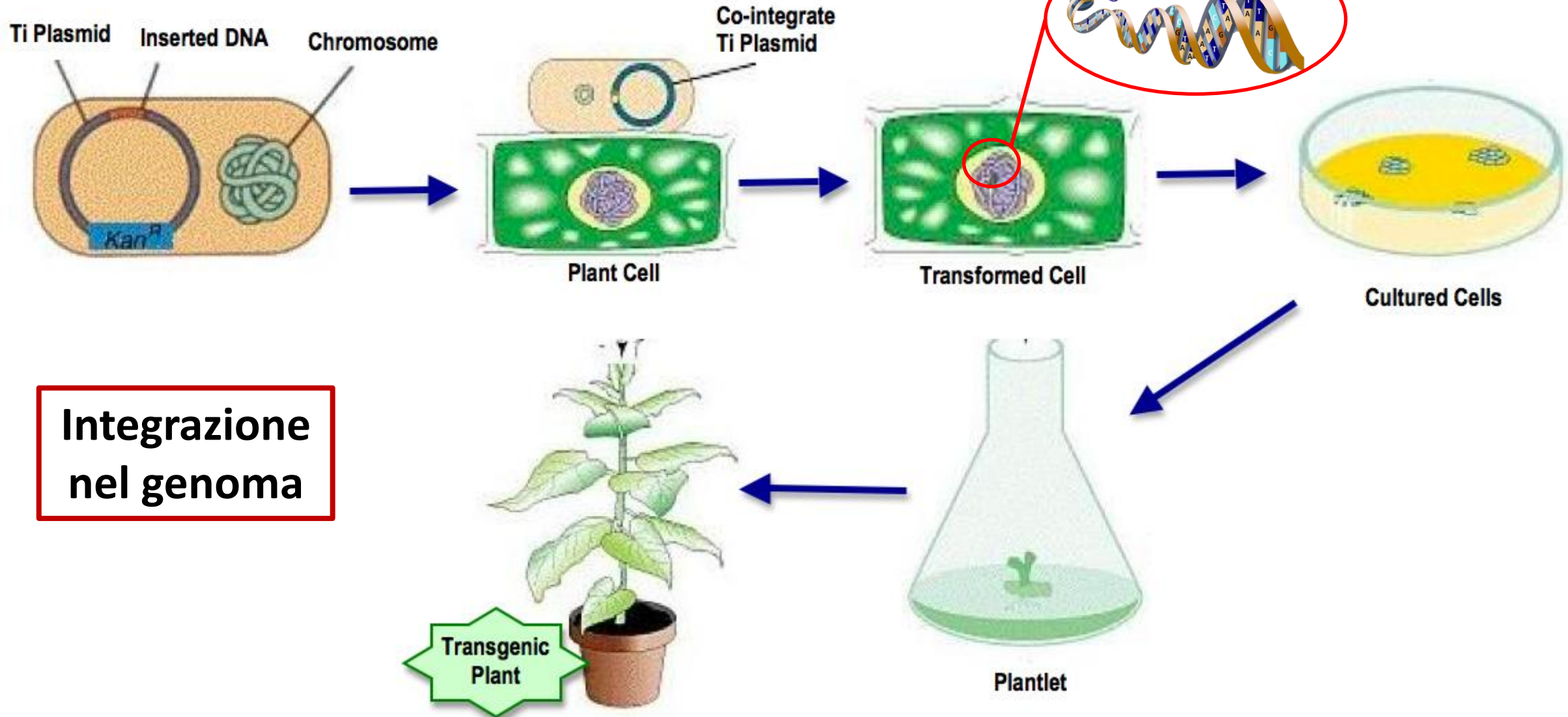
L'AGROBATTERIO - meccanismo



- 1. ATTACCO:** l'agrobatterio è attratto da messaggeri chimici emessi dalla pianta in caso di ferite. Quindi, con il flagello, si muove verso la ferita e si «aggancia» alla pianta assieme ad altri batteri, formando una colonia.
- 2. ANCORAGGIO TRAMITE PILUS:** sempre sotto stimolo di messaggeri chimici rilasciati dalla pianta ferita (fenoli), il sensore VirA/VirG si attiva. Questo sensore a sua volta attiva i geni della regione Vir, tra cui VirB responsabile della produzione del PILUS (pilus T). Il pilus ancora il batterio alla cellula vegetale e permette il passaggio del materiale genetico.
- 3. TRASFERIMENTO DEL T-DNA:** i) VirD1 e VirD2 riconoscono left e right border e li tagliano. ii) Il T-DNA libero viene sintetizzato e legato a VirE e VirD2. iii) VirE/D2 vengono riconosciuti dalla pianta come proteina importina, il T-DNA viene così portato nel nucleo e integrato al genoma tramite ricombinazione omologa grazie a VIP1 e VIP2.
- 4. TRASCRIZIONE E TRADUZIONE:** a questo punto i geni presenti sul T-DNA vengono trascritti e tradotti dalla pianta stessa, dando via alla patologia.



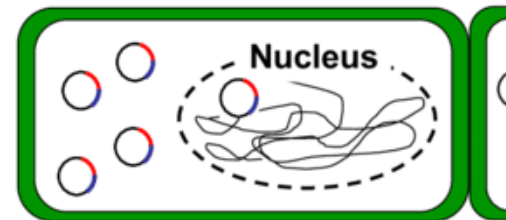
L'AGROBACTERIO – trasformazione stabile



L'AGROBATTERIO – trasformazione transiente

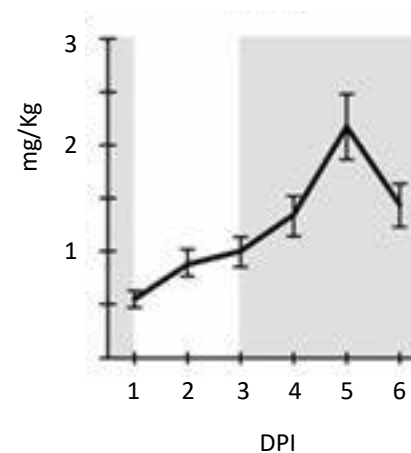


Transient transformant



Transient expression from
extra-chromosomal plasmids

Produzione temporanea della
proteina solo nei tessuti entrati in
contatto con il batterio.



Produzione della proteina per pochi giorni
(picco a 4-7). Poi inizia la degradazione del
plasmide e cessa la produzione.

NO
integrazione
nel genoma

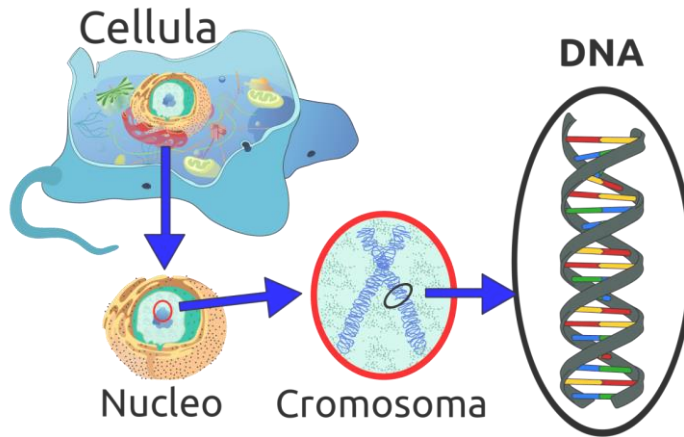
CLONAGGIO

«Clonaggio, con riferimento a frammenti di DNA, è un insieme di metodi sperimentali nella biologia molecolare che descrive l'assemblaggio di molecole ricombinanti e, dunque, una serie di tecniche con le quali è possibile ottenere più copie di una determinata sequenza nucleotidica, non necessariamente di natura genica.

L'uso del termine clonaggio si riferisce al fatto che il metodo includa la replicazione di una molecola per produrre una colonia di cellule con le stesse molecole di DNA.»

Una volta, gene isolato da genoma con enzimi di restrizione e inserito in un vettore, oggi DNA amplificato tramite PCR.

**DA DOVE
PRENDO IL DNA
DI PARTENZA?**



**DIRETTAMENTE DALL'ORGANISMO
DI PARTENZA**

- Meno costoso
- Sequenza identica all'originale
- Posso usare anche mRNA



**DNA SINTETIZZATO INSERITO IN
VETTORE COMMERCIALE**

- Più costoso
- Possibilità di aggiungere/modificare sequenze
- Possibilità di ottimizzare la sequenza in base all'organismo di espressione



CLONAGGIO

Tipi di host



Prokaryotic expression

BATTERI (principalmente *E. coli*):

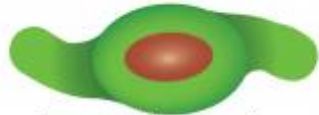
- Poco costoso e veloce
- Elevato livello di espressione
- No PTM
- Solo per piccole proteine



Yeast expression

LIEVITI (*S. cerevisiae*, *P. pastoris*):

- Poco costoso
- Buon livello di espressione
- Alcune PTM
- No selezione antibiotica



Insect cell expression

BACULOVIRUS-INSECT CELLS (*Drosophila*):

- Costoso
- Elevato livello di espressione
- PTM
- No selezione antibiotica



Mammalian cell expression

MAMMALIAN (*CHO*, *Hela*):

- Costoso e lungo
- Basso livello di espressione
- PTM
- No selezione antibiotica



CELL-FREE EXPRESSION SYSTEM:

- Costoso

PIANTE



- Poco costoso
- Buon livello di espressione
- Trasformazione stabile o transiente
- PTM
- Tutte le proteine
- Selezione con alcuni tipi di antibiotici possibile



Espressione transiente in *N. benthamiana*



Espressione stabile in *O. sativa*

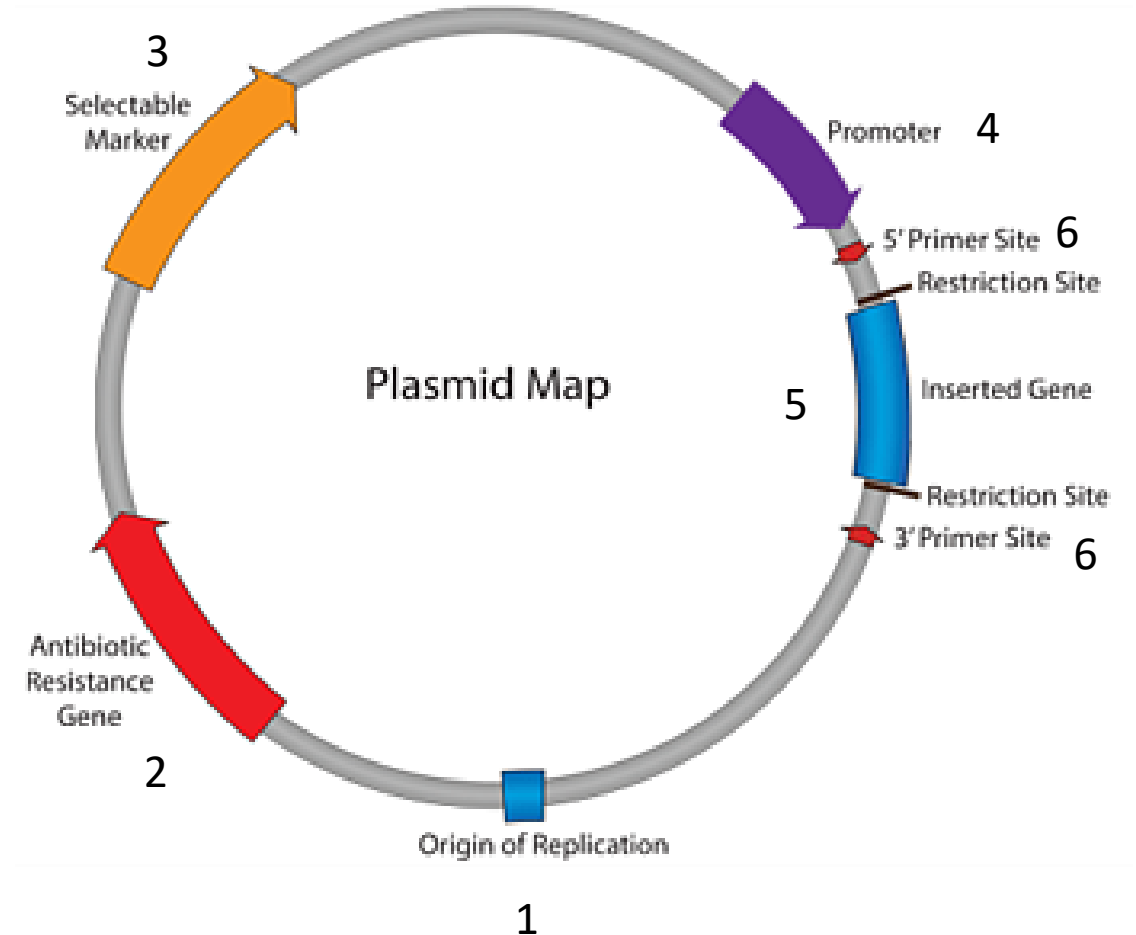
VETTORI

- 1. ORIGINE DELLA REPLICAZIONE:** (*ori*) sequenza nel genoma dalla quale inizia la replicazione del DNA. Controlla la replicazione e il numero di copie prodotte (Low-High copy).
- 2. ANTIBIOTICO RESISTENZA**
- 3. MARKER DI SELEZIONE:** gene che conferisce un tratto utile alla selezione artificiale.
- 4. PROMOTER:** regione dalla quale inizia la TRASCRIZIONE, controlla il legame della RNA polimerasi.
- 5. SITO POLILINKER (o multiple cloning site MSC):** zona del plasmide ricca di sequenze per gli enzimi di restrizione, la proteina generalmente viene inserita in questa zona.



- 6. 5' e 3' SITI PER PRIMER :** regione a cui si allineano i primer forward e reverse durante l'amplificazione del DNA tramite PCR.

Possibilità di aggiungere TAGS all' N o al C terminale della proteina

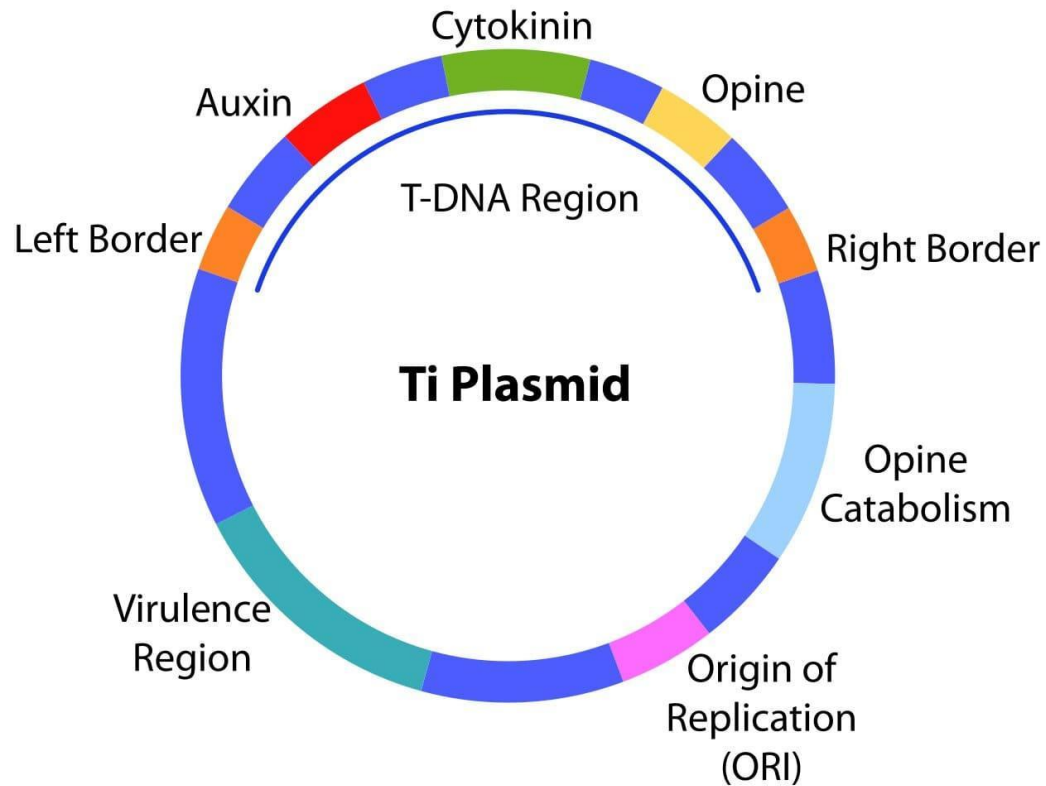


I plasmidi sono specifici per l'HOST!



VETTORI PER AGROINFILTRAZIONE

Il plasmide Ti



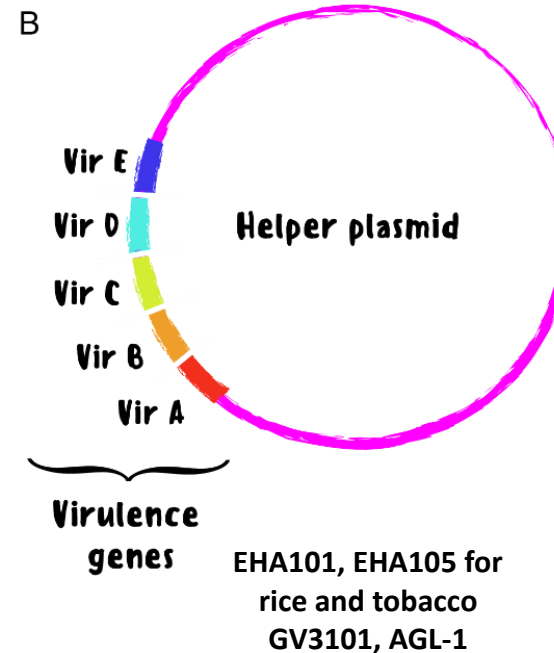
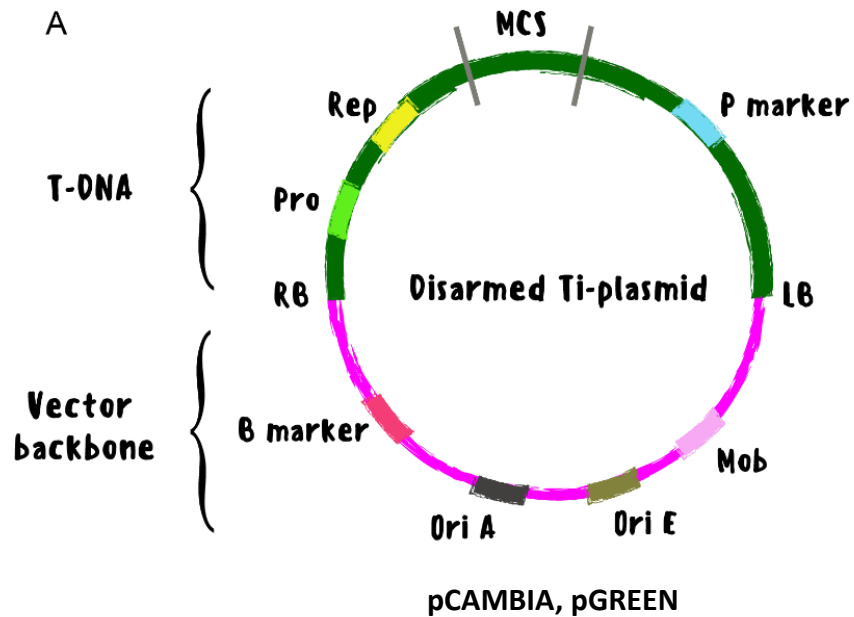
- Negli anni '40 prima connessione tra tumori delle piante e batteri. Negli anni 80 primo sequenziamento di un Ti plasmid (Tumor inducing).
- Fondamentale per la virulenza dell'agrobatterio
- Generalmente >100 Kpb
- **Vir region:** regione che codifica per i fattori di virulenza che permettono al batterio di infettare la pianta.
- **ORI:** replicazione batterica (low copy)
- **T-DNA:** zona tra il bordo di destra e quello di sinistra che viene inserita per coniugazione all'interno del genoma della pianta. Solitamente contiene 8 geni specifici. Contiene le informazioni per la produzione di ormoni vegetali (come auxine e citochine) e di opine (aminoacidi inusuali utilizzati dai batteri come nutrienti, non utilizzabili dalla pianta).

Virulence region



VETTORI PER AGROINFILTRAZIONE

Vettori binari



Plasmide Ti disarmato:

- Dimensioni contenute (3 kbp)
- Origine di replicazione per coli e agrobatterio
- Left e Right border
- Marker di selezione per le piante (resistenza Kan/Gen/Hygr; PMI)
- Rep: gene reporter (GFP, GUS)
- Sito polilinker
- Promotore leggibile solo dalle piante (**CAMV 35S**)
- Marker di selezione per batteri (resistenza antibiotici; generalmente Kan)

Plasmide «helper»:

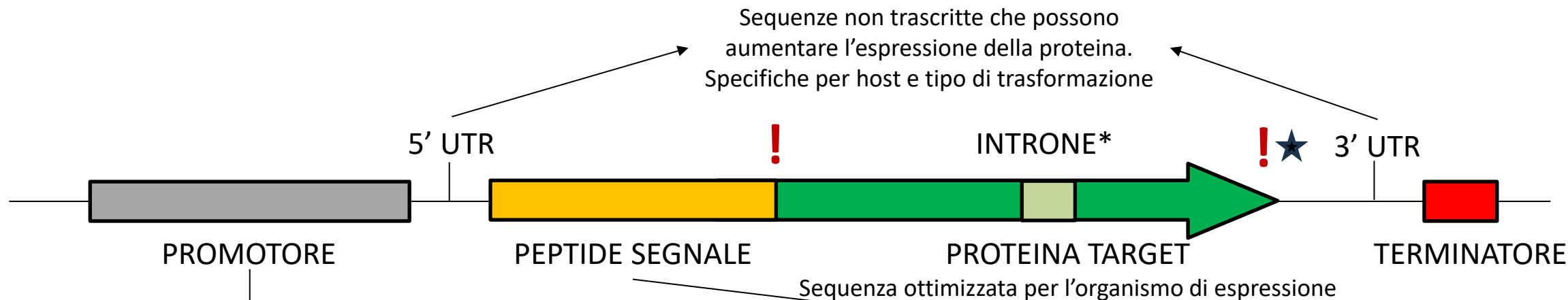
- Contiene i geni di virulenza

Addizionale: Sequenza per inibire il silenziamento del gene p19 e NSs da virus del pomodoro



VETTORI PER AGROINFILTRAZIONE

Come costruire il mio gene - cassette



Quando e dove voglio che si esprima la mia proteina?

- Deve essere letto dal mio host di espressione (la pianta) ma non da quello di clonaggio (coli e agrobatterio)
- Può essere inducibile (Ramy3D) o costitutivo (35S)
- Può essere tessuto-specifico (GluB4)

In quale compartimento cellulare voglio che vada?

- La proteina deve passare per ER per glicosilazione e ponti disolfuro
- Proteina secreta in apoplasto (Pr1A)
- Proteina in vacuolo
- Proteina in cloroplasto
- Proteina accumulata in seme (GluB4)

! Aggiunta di un TAG per purificazione (es HIS) o visualizzazione veloce delle proteine (es GFP):

- Al N-terminale (tenere conto che il peptide segnale viene tagliato)
- Al C-terminale (garantisce di purificare la proteina trascritta per intero)

★ Sequenza per ritenzione in ER (es KDEL)

* Introne: garantisce che solo organismi superiori producano la proteina corretta



VETTORI PER AGROINFILTRAZIONE

Il promotore 35S

- Cauliflower mosaic virus promoter



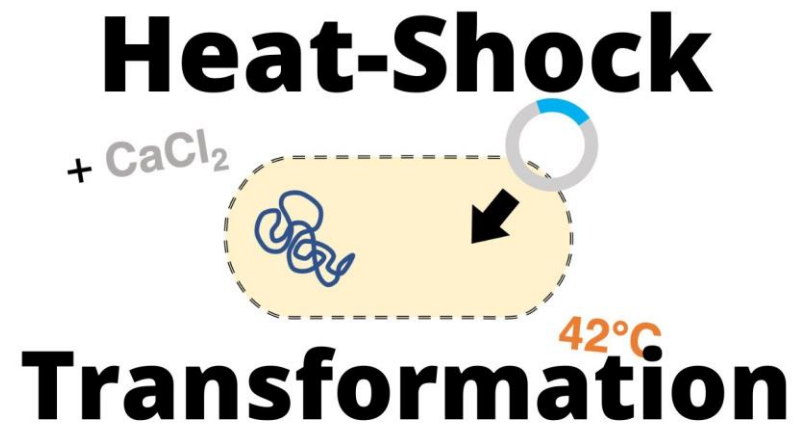
- Promotore costitutivo più utilizzato nelle colture OGM
- Talmente comune che in commercio si usano kit per detectare la presenza del promotore 35S per distinguere tra coltura OGM e non-OGM



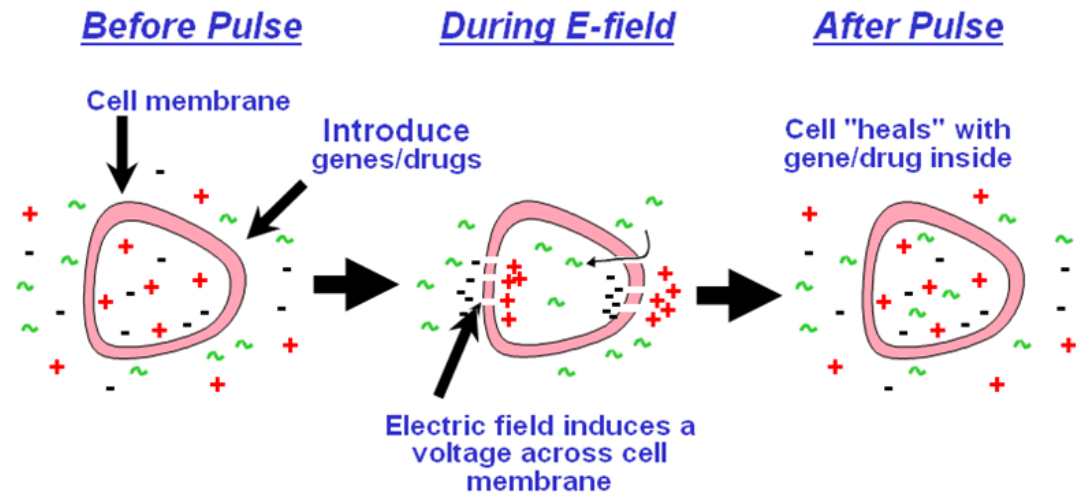
TRASFORMAZIONE BATTERICA

Per trasformare un batterio, questo deve essere COMPETENTE. La competenza è la capacità delle cellule di assorbire il DNA che è liberamente presente nel mezzo circostante.

SHOCK TERMICO



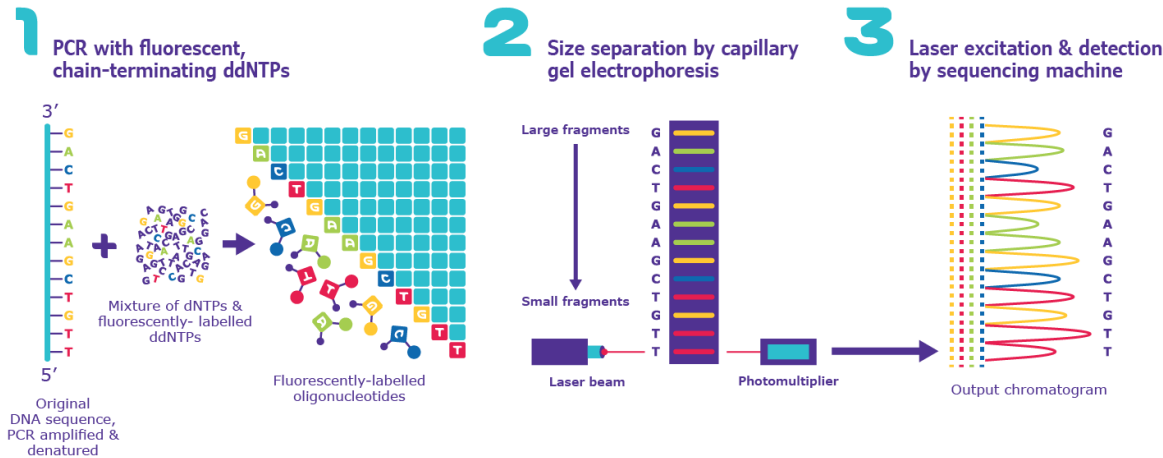
ELETTROPORAZIONE



COME CONTROLLO IL MIO DNA?

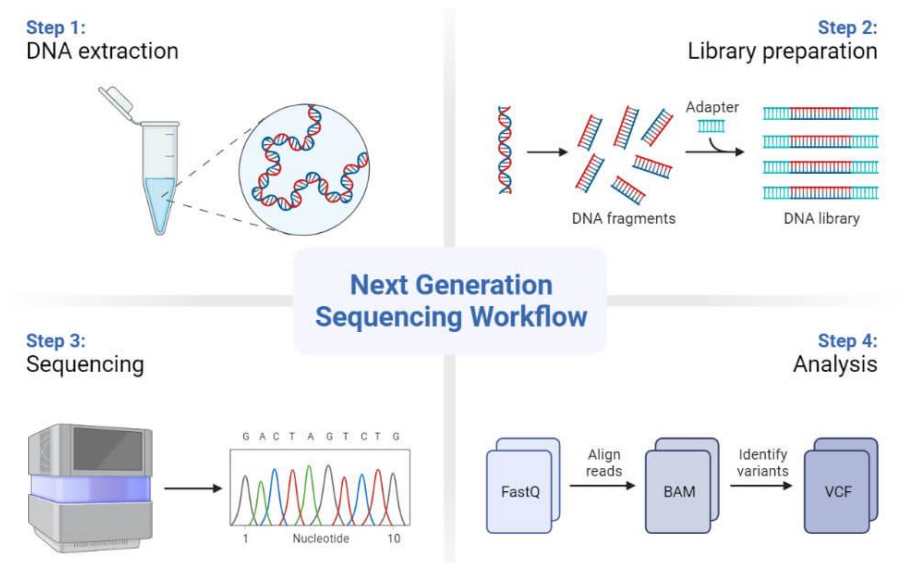
Plasmide – Sanger sequencing

- Inventato nel 1977 dal premio Nobel Frederick Sanger
- Detto anche «metodo di terminazione della catena»
- NON è UNA NORMALE AMPLIFICAZIONE PCR
- **Permette di sequenziare fino a 900 bp per volta con elevata affidabilità**
- **Economico**
- Sia manuale che automatico



Genoma – Next generation sequencing

- Detto anche «metodo da estensione»
- **Permette di sequenziare intero genoma con buona affidabilità**
- **Molto costoso**
- Automatico
- Richiede personale in grado di leggere i risultati



[Sequenziamento con metodo Sanger, procedura e passaggi \(sigmaaldrich.com\)](http://sigmaaldrich.com)



CLONAGGIO

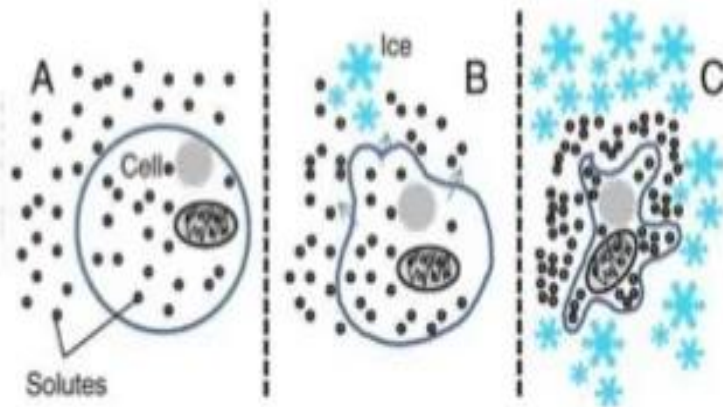
Programmi utili



SnapGene[®]
Software for molecular biology



CONSERVAZIONE DELLE CELLULE



CRIOPROTETTORI

- Macromolecole, come il glicerolo, sono usate per proteggere i tessuti dal congelamento
- Quando il ghiaccio si forma all'esterno, l'acqua all'interno della cellula esce per diluire i soluti che si sono concentrati all'esterno
- I crioprotettori prevengono la fuoriuscita della totalità dell'acqua dalla cellula, aumentando la concentrazione dei soluti all'interno della cellula



Azoto liquido -192°C
Freezer -80°C

A COSA DEVO STARE ATTENTO?

Università VS Azienda



Identificare chiaramente
gli **OBBIETTIVI** DA
RAGGIUNGERE



Valutare attentamente la presenza
di **BREVETTI** sia per il prodotto
finale che per le tecniche utilizzate



Tenere sempre a mente
COSTI E **TEMPISTICHE**



Emmanuelle Charpentier e
Jennifer A. Doudna,
**Premio Nobel per la chimica del
2020**



Il caso di CRISPR-CAS9 Gene-editing

Semplice
Preciso
Rapido

↳ Licenza per ricerca → gratuita
↳ Licenza per aziende → \$\$\$\$\$





Biotechnologie applicate

TRANSACTIVA⁺
MOLECULAR
FARMING
sustainable biologics

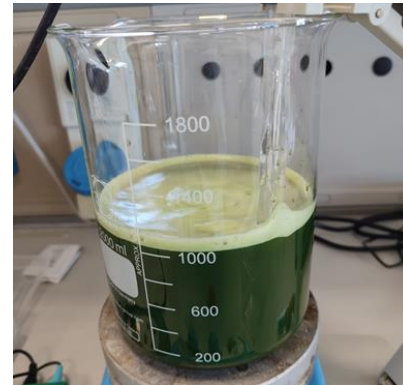
PLANT MOLECULAR FARMING: PLANT TRANSFORMATION AND GROWTH

Piattaforme in Transactiva

Semi di riso



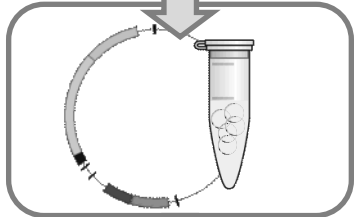
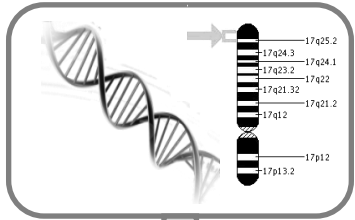
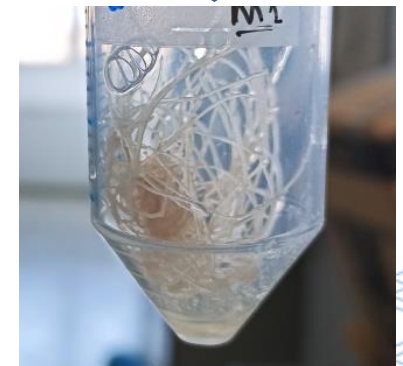
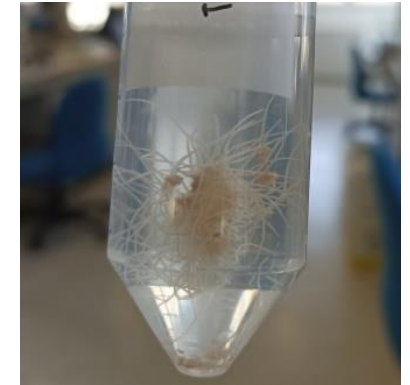
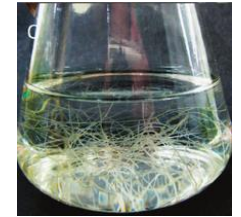
Nicotiana benthamiana



Cell cultures



Hairy Roots



**Desirable
proteins**

Pro & Contro



Riso - Pro

- ✓ Stabilità
- ✓ Conservazione dei semi
- ✓ Facile purificazione
- ✓ Resa per ogni ciclo
- ✓ Consumo energetico (Molto basso)

Riso - Contro

- ✓ Limitazioni geografiche (OGM)
- ✓ Tempo
- ✓ Variabilità della produttività



Nicotiana – Pro

- ✓ Rapidità
- ✓ Flessibilità
- ✓ Non OGM
- ✓ Facile da coltivare
- ✓ Rapporto resa/superficie
- ✓ Nessuna limitazione geografica

Nicotiana – Contro

- ✓ Elevato fabbisogno di manodopera
- ✓ Complessità nella purificazione
- ✓ Consumo energetico (Alto)

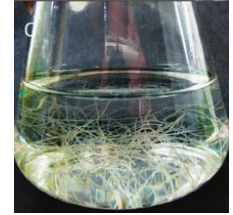


Cell cultures – Pro

- ✓ Biorattore “standard”
- ✓ Conforme alle cGMP
- ✓ Produzione continua o inducibile

Cell cultures – Contro

- ✓ Moltiplicazione biomassa lenta
- ✓ Manutenzione «Cell bank»
- ✓ Bassa resa
- ✓ Consumo energetico (Alto)



Hairy Roots – Pro

- ✓ Biorattore “standard”*
- ✓ Conforme alle cGMP
- ✓ Produzione continua o inducibile
- ✓ Bassa sensibilità (rispetto alle linee cellulari)
- ✓ Crescita rapida

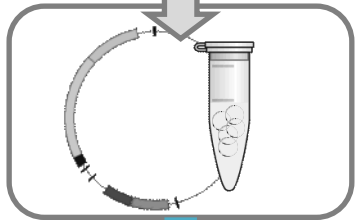
Hairy Roots – Contro

- ✓ Resa bassa
- ✓ Consumo energetico (alto)
- ✓ “Root bank”



La pipeline

Piante transgeniche di riso e bioreattori cellulari



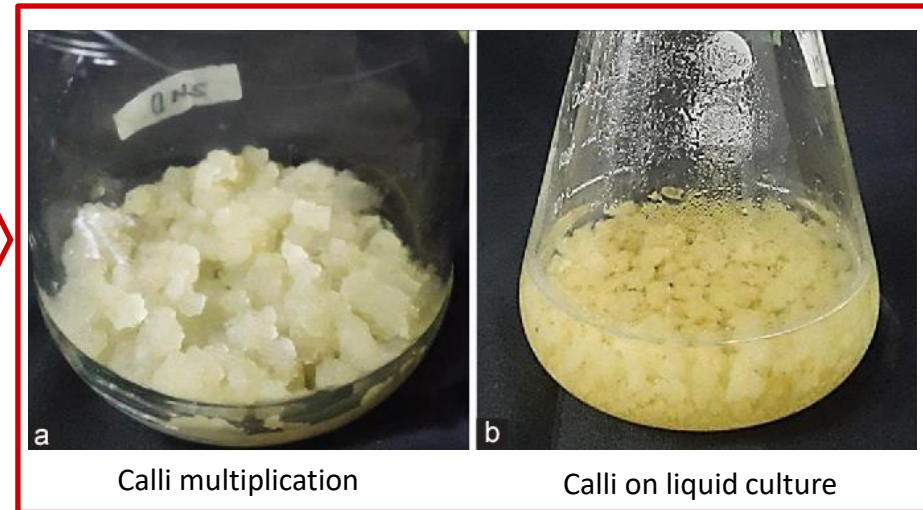
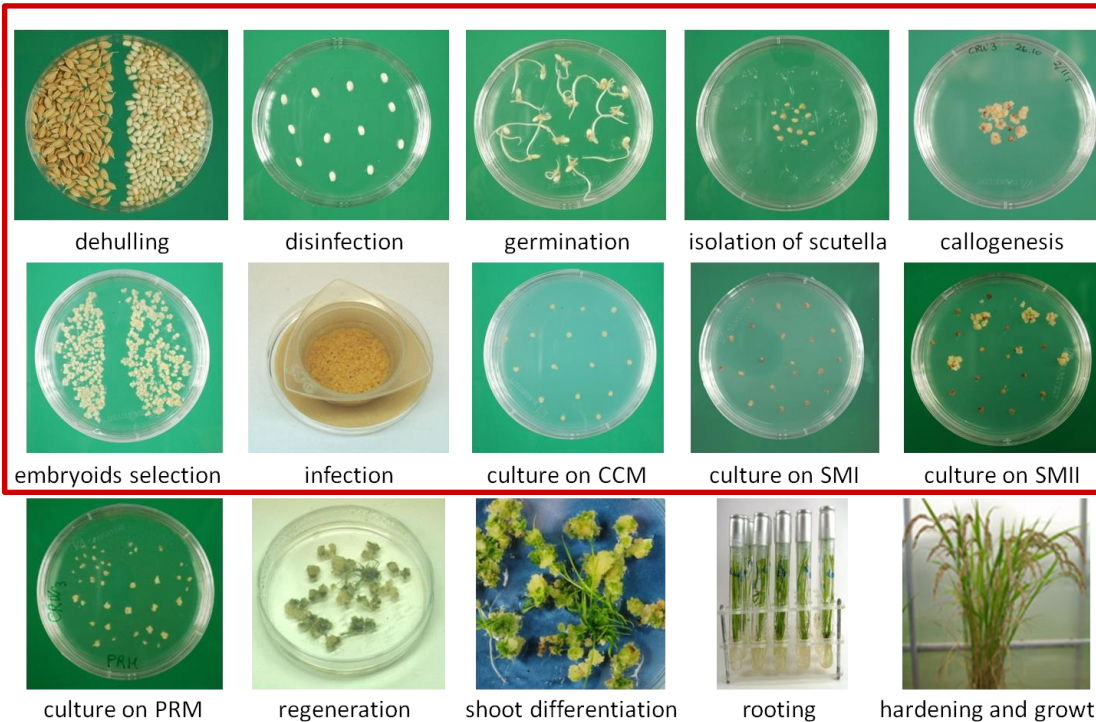
Desirable proteins



Riso

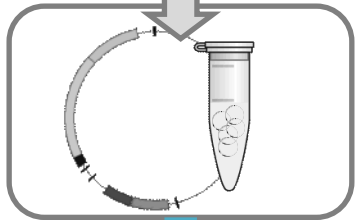


Cell cultures



La pipeline

Foglie di tabacco transiente e Hairy Roots



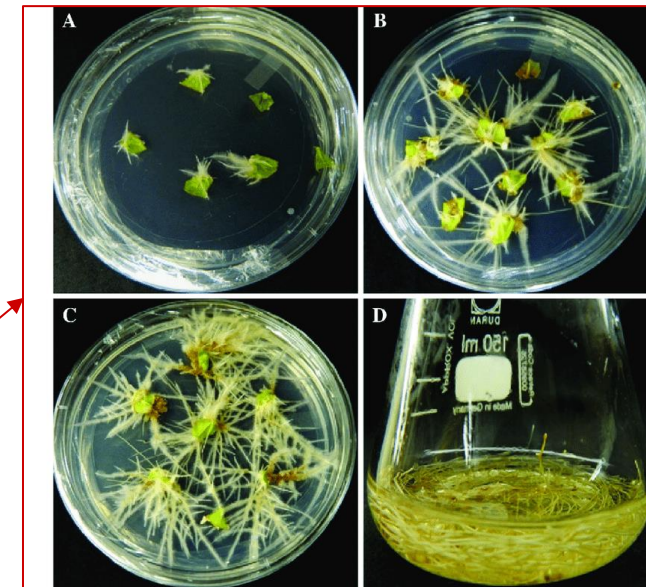
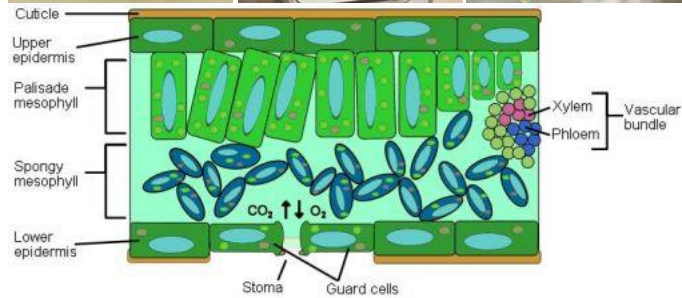
Desirable proteins



Tabacco



Hairy roots



Vantaggi e svantaggi: trasformazione stabile e trasformazione transiente

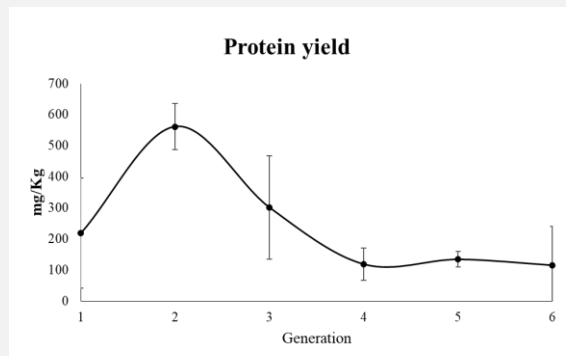
Trasformazione stabile

Vantaggi

- Integrazione permanente del transgene nel genoma → ereditarietà assicurata
- Produzione a lungo termine della proteina o carattere desiderato
- Ideale per linee geneticamente modificate (OGM) e coltivazioni commerciali
- Utile per studi su tratti genetici complessi o modifiche durature

Svantaggi

- Processo lungo e laborioso (generazioni)
- Basso tasso di trasformazione in molte specie
- Rischio di effetti posizionali (variazioni di espressione in base al sito d'integrazione)
- Sottoposto a regolamentazioni più severe (OGM)



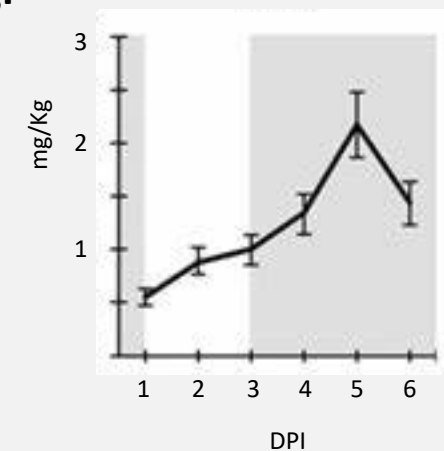
Trasformazione transiente

Vantaggi

- Rapida espressione genica (da poche ore a pochi giorni)
- Nessuna integrazione nel genoma → ideale per test preliminari
- Alta efficienza di trasformazione in tessuti vegetali
- Utile per produzione veloce di proteine ricombinanti (es. vaccini, anticorpi)
- Non sempre soggetta alla normativa OGM, a seconda del contesto

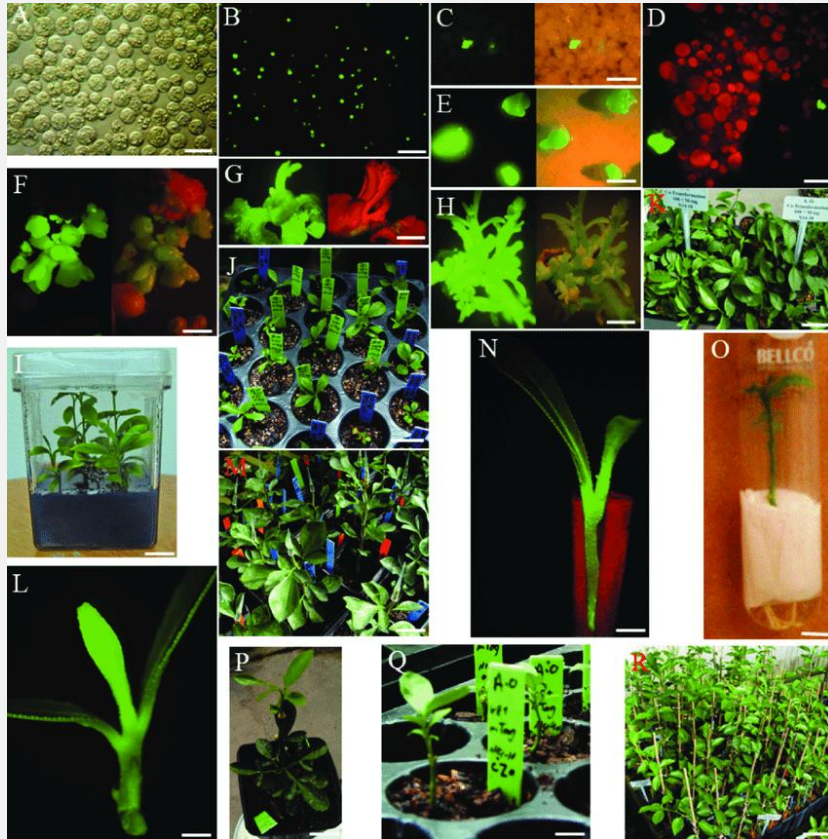
Svantaggi

- Espressione temporanea e non ereditaria
- Ripetibilità limitata nel tempo → va rifatta per ogni ciclo
- Non adatta a coltivazioni stabili

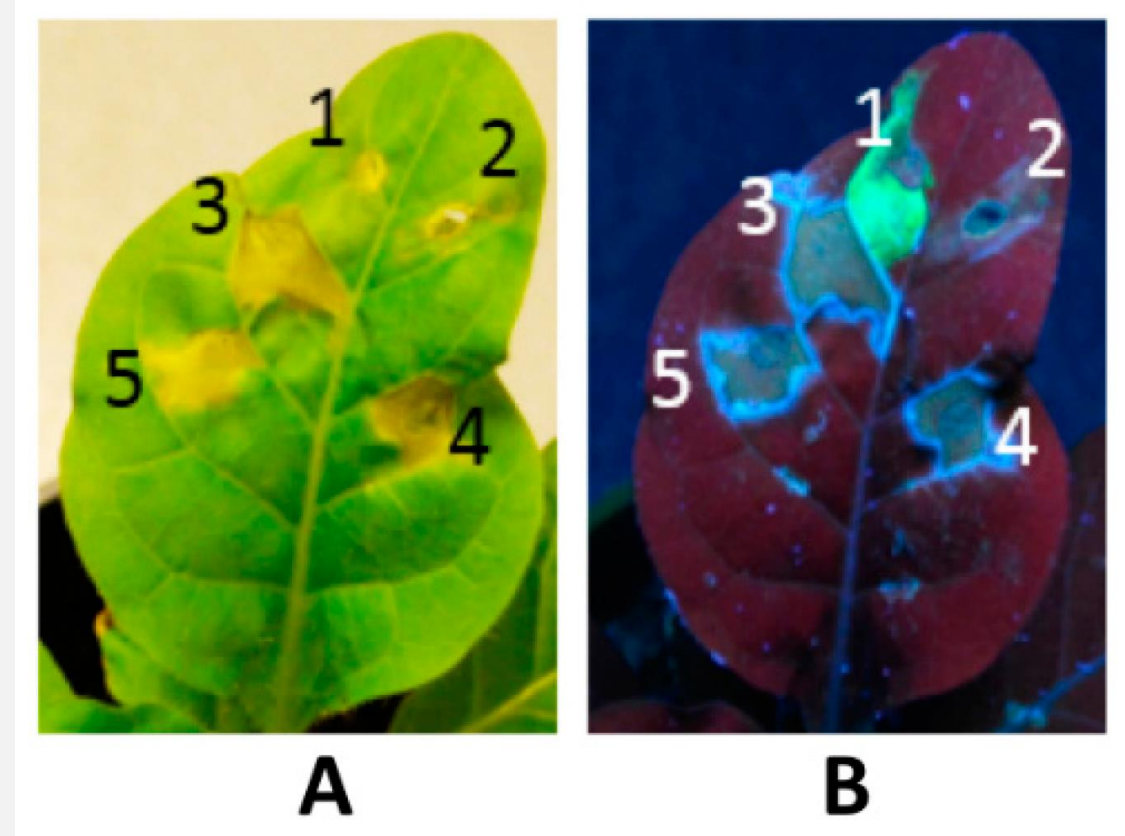


Vantaggi e svantaggi: trasformazione stabile e trasformazione transiente

Trasformazione stabile



Trasformazione transiente



Trasformazione biomassa seguita tramite GFP

Vantaggi e svantaggi: coltivazione su suolo e vertical farming

Coltivazione su suolo



Vantaggi

- Costo iniziale basso
- Adatta per colture estensive
- Utilizzo di risorse naturali
- Tecnologia collaudata e conosciuta da secoli

Svantaggi

- Dipendenza da condizioni climatiche
- Uso intensivo del suolo
- Consumo elevato di acqua e pesticidi
- Bassa efficienza per unità di superficie
- Limitazioni geografiche

Vertical farming



Vantaggi

- Uso ottimale dello spazio
- Controllo totale del microclima
- Ridotto uso di acqua
- Assenza o drastica riduzione di pesticidi
- Produzione tutto l'anno
- Possibilità di coltivare in ambienti urbani

Svantaggi

- Alto costo iniziale
- Alto consumo energetico
- Limitata varietà di colture
- Richiede competenze tecniche avanzate





Biotechnologie applicate

Plant Molecular Farming: downstream process

Definizione del downstream process in generale

Upstream process: coltura delle cellule o dell'organismo ospite che esprime la proteina di interesse



Proteina espressa nella biomassa



Downstream process: estrazione e purificazione



Drug Substance o ingrediente attivo



Formulazione: preparazione del Drug Product o del cosmetico



Contesto: piccola biotech, sviluppo iniziale in ambito farma

- Produzione di piccoli lotti in ambiente non regolamentato, non-GMP;
- Lotti destinati alla preclinica non regolatoria;
- Trasferimento tecnologico a soggetti che producono i lotti per la preclinica regolatoria;



Industrializzabilità

- Materiali che hanno una controparte utilizzabile in regime GMP;
- Metodi applicabili in GMP e scalabili industrialmente;
- Fattibilità economica: analisi dei costi preliminare.



Industrializzabilità ambito dermocosmetico

- Materiali food-grade che permettano una scalabilità all'interno dell'azienda;
- Metodi conformi al sistema ISO 9001;
- Meticoloso controllo dei costi.



Fasi della purificazione di una proteina in generale

Estrazione

- Rottura della biomassa
- Proteina in una soluzione stabile
- Scopo: miscela manipolabile

Chiarificazione

- Separazione solido-liquido
- Pre-filtrazione
- Microfiltrazione
- Scopo: soluzione limpida

Concentrazione

- Ultrafiltrazione
- Scopo: riduzione dei costi e dei tempi nella fase cromatografica

Cromatografia

- Successione di passaggi
- Scopo: purificazione della proteina

Metodi analitici per la strategia di controllo, ELISA , SDS-PAGE ecc



Due esempi di biomasse vegetali

Seme di riso



Foglia di tabacco



Due metodi di estrazione diversi.
Resto del processo simile.



Estrazione da seme di riso

- Macinazione del riso sbiancato;



- Incubazione della farina con il tampone di estrazione;
 - Impatto del rapporto volume tampone/volume farina;
 - Impatto di estrazioni sequenziali;
 - Impatto della composizione del tampone.



Estrazione da foglia di tabacco

- Estrazione per spappolamento in presenza di tampone;
 - Impatto del rapporto volume tampone/peso foglia;
 - Ottimizzazione della composizione del tampone.



Chiarificazione: tecniche di separazione solido-liquido

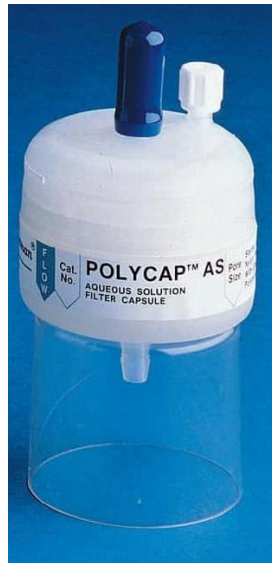
Centrifugazione, su scala di laboratorio, o controparti su scala industriale (centrifughe a dischi, decanter)



Pre-filtrazione e microfiltrazione



in più stadi

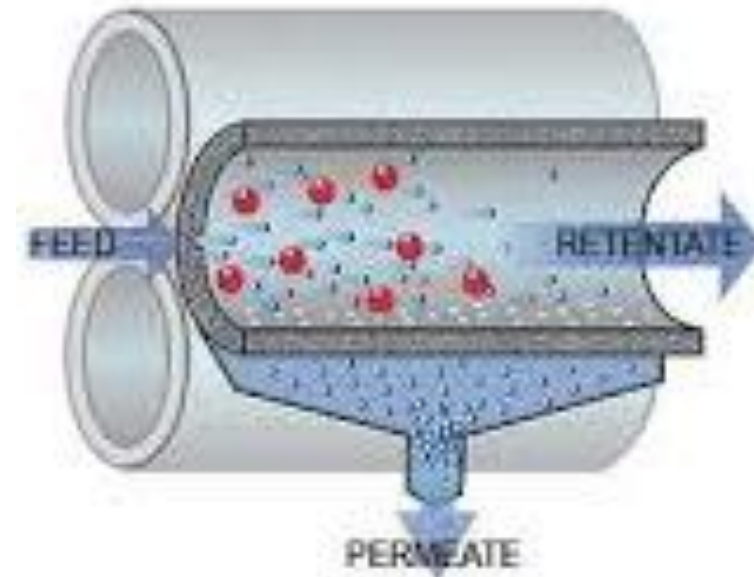


in un'unica soluzione



Concentrazione per ultrafiltrazione

Ultrafiltrazione a flusso tangenziale attraverso cartucce a fibre cave.



Dai 200 mL ai 20 L:

- 2 pompe peristaltiche, max 2L/min e 16L/min
- Cartucce dai 140 cm² ai 4800 cm²

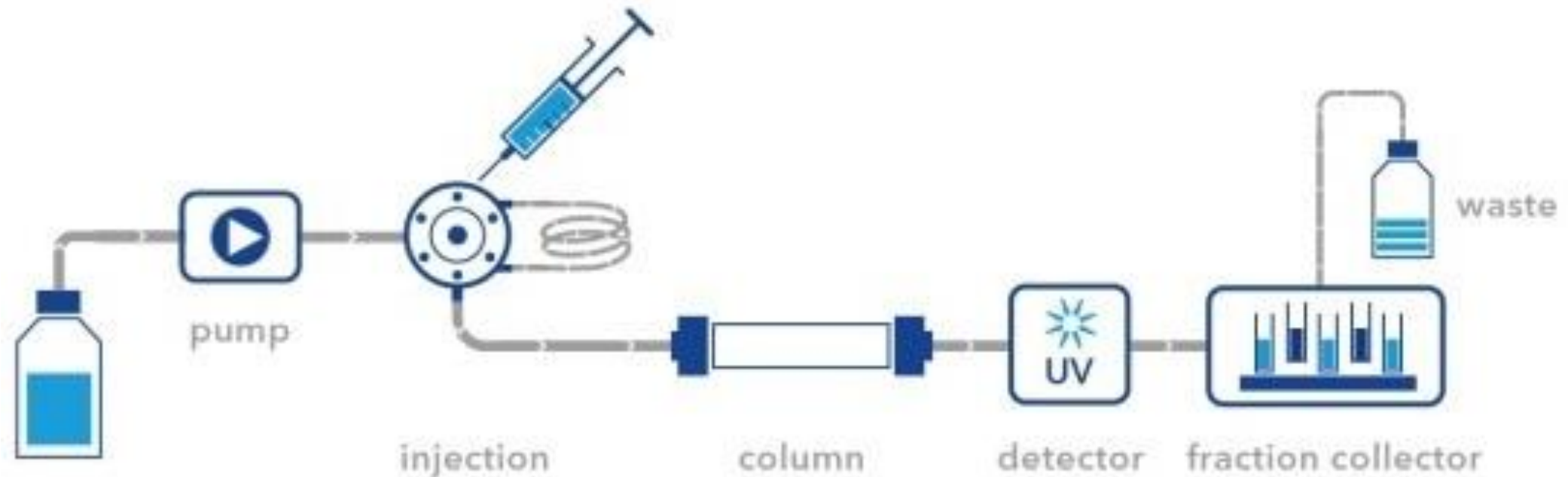


Cromatografia preparativa di proteine in generale

FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)

Pressioni d'esercizio dai 4 ai 20 bar

- Un'unica architettura di sistema
- Varie tecniche basate su varie fasi stazionarie



Caso classico: sequenza di tre passaggi

Capturing

- Isolamento della frazione proteica d'interesse
- Riduzione del volume
- >50% di proteina di interesse
- Scopo: concentrare e arricchire

Intermediate

- Separazione proteica
- >98%
- Scopo: abbattere la concentrazione delle proteine dell'ospite

Polishing

- Eliminazione dimeri e altri aggregati
- Eliminazione forme tronche o glicoforme indesiderate
- Scopo: prodotto omogeneo



Cromatografia di affinità e processo a due passaggi

Capturing

- Isolamento della proteina di interesse
- Riduzione drastica del volume
- >98% di proteina di interesse
- Scopo: concentrare e purificare la proteina di interesse

Polishing

- Eliminazione dimeri e altri aggregati
- Eliminazione forme tronche o glicofornie indesiderate
- Scopo: prodotto omogeneo



Polising con tecniche in FlowThrough

Passaggi cromatografici
che trattengono specifici
impurezze o contaminanti:

- Membrane per la cattura di DNA, di endotossine
- Colonne per la rimozione di aggregati



Preparazione di piccoli lotti in Transactiva

Akta Purifier UPC-100

- Detector di UV, conduttanza e pH;
- Flusso massimo 100 mL/min;
- Scala dai microgrammi ai grammi;
- Software dedicato.



Due esempi di proteine e relativo processo cromatografico

Gcasi

Enzima lisosomiale,
relativamente lipofilo



Purificazione in tre
passaggi:

- **HIC** (Hydrophobic Interac.)
- **IEX** (Ion Exchange)
- **GF** (Gel Filtration)

IgG

Disponibilità di tecniche di
affinità consolidate



Purificazione in tre
passaggi:

- Proteina A
- **MMC** (Mixed Mode)



Gcasi: processo in tre passaggi

Capturing

- Resina Octyl-Sepharose;
- Eluizione in 20% glicole propilenico;
- >60% di proteina di interesse.

Gruppi ottilici C8 su agarosio reticolato →
Cromatografia interazione idrofobica HIC
Glicole propilenico riduce interazione idrofobica

Intermediate

- Resina S-Sepharose, gruppi funzionali SO_3^-
- Eluizione per aumento forza ionica
- >98%

Gruppo solfopropilico su microsfere di agarosio reticolato → Cromatografia a scambio ionico CEX (cationica forte)
Aumento forza ionica con NaCl per eluizione selettiva

Polishing

- Superdex 200
- Buona risoluzione dai 5 ai 300 kDa
- >99%

Destrano altamente reticolato su agarosio –
Cromatografia di esclusione molecolare SEC



IgG: affinità e polishing

Capturing

- Resina KanCapA 3G (ProtA)
- Alta affinità per IgG umane
- Eluizione a pH 3,5
- >98% di proteina di interesse

Cromatografia di affinità con Proteina A (proteina batterica che lega IgG nella Fc) a pH fisiologico.
Modifica del pH con acido citrico o glicina rompe il legame

Polishing

- Resina CMM
- Affinità differenziale per forme aggregate o tronche
- >99%

Interazioni multiple (ioniche, idrofobiche, idrogeno...) e buffer di eluzione studiato sulla proteina (pH, Sali, solventi, detergenti)



Cambio tampone e regolazione della concentrazione finale

Il tampone di uscita dal ultimo passaggio cromatografico viene sostituito con un tampone compatibile con le esigenze per cui il lotto è stato prodotto.

Due metodi:

- Dispositivi centrifughi usa e getta
- Sistema di ultrafiltrazione in configurazione di minimo volume morto





Biotechnologie applicate

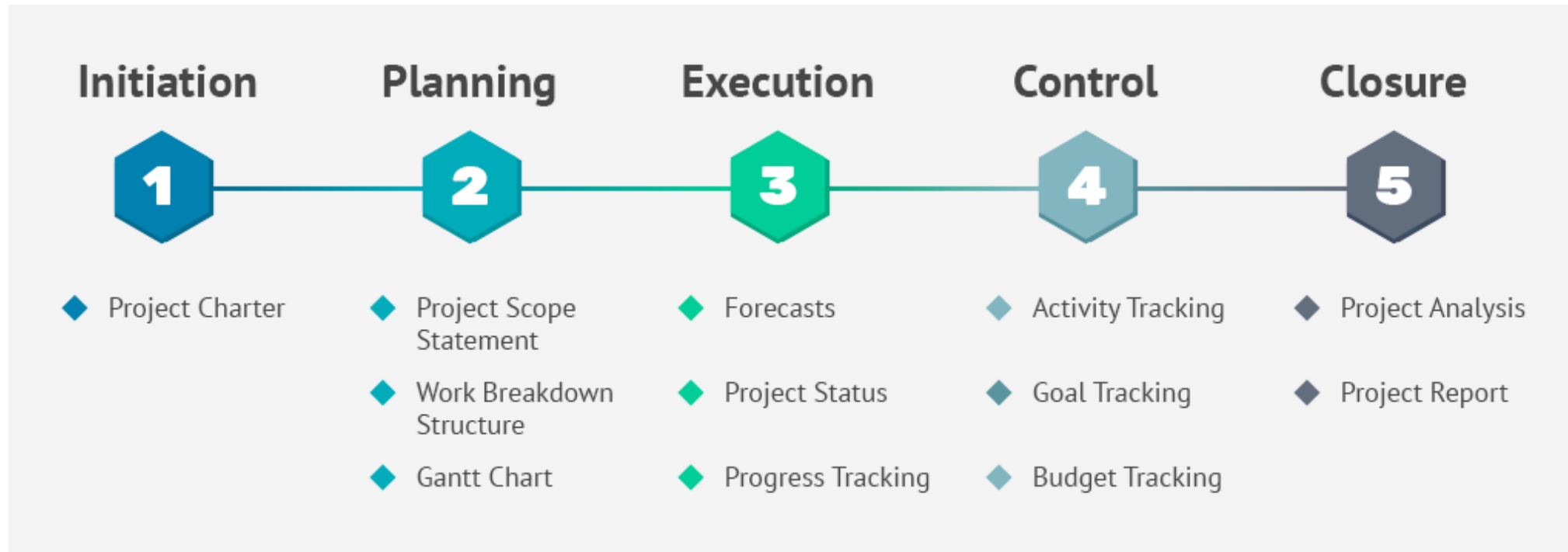
Plant Molecular Farming: pianificare il progetto

Ricerca in azienda

Punti importanti da sapere



Project Management



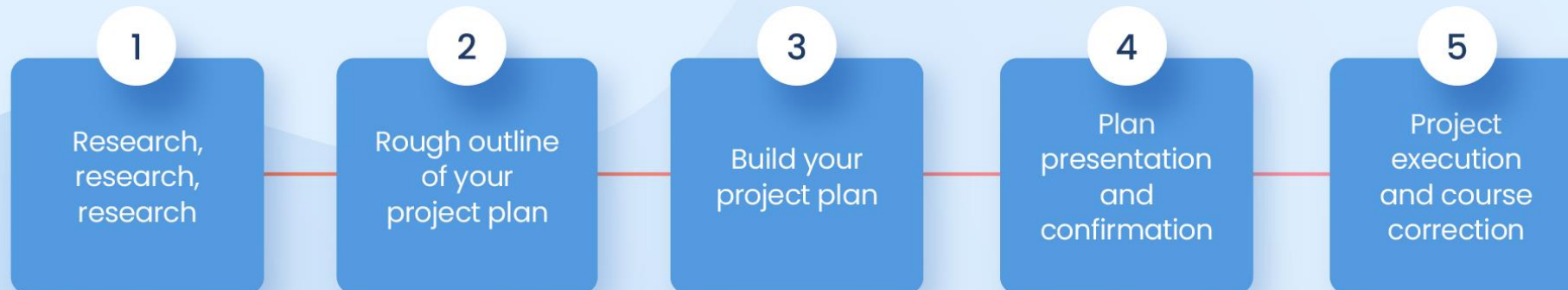
Ricerca in azienda

Punti importanti da sapere: pianificazione



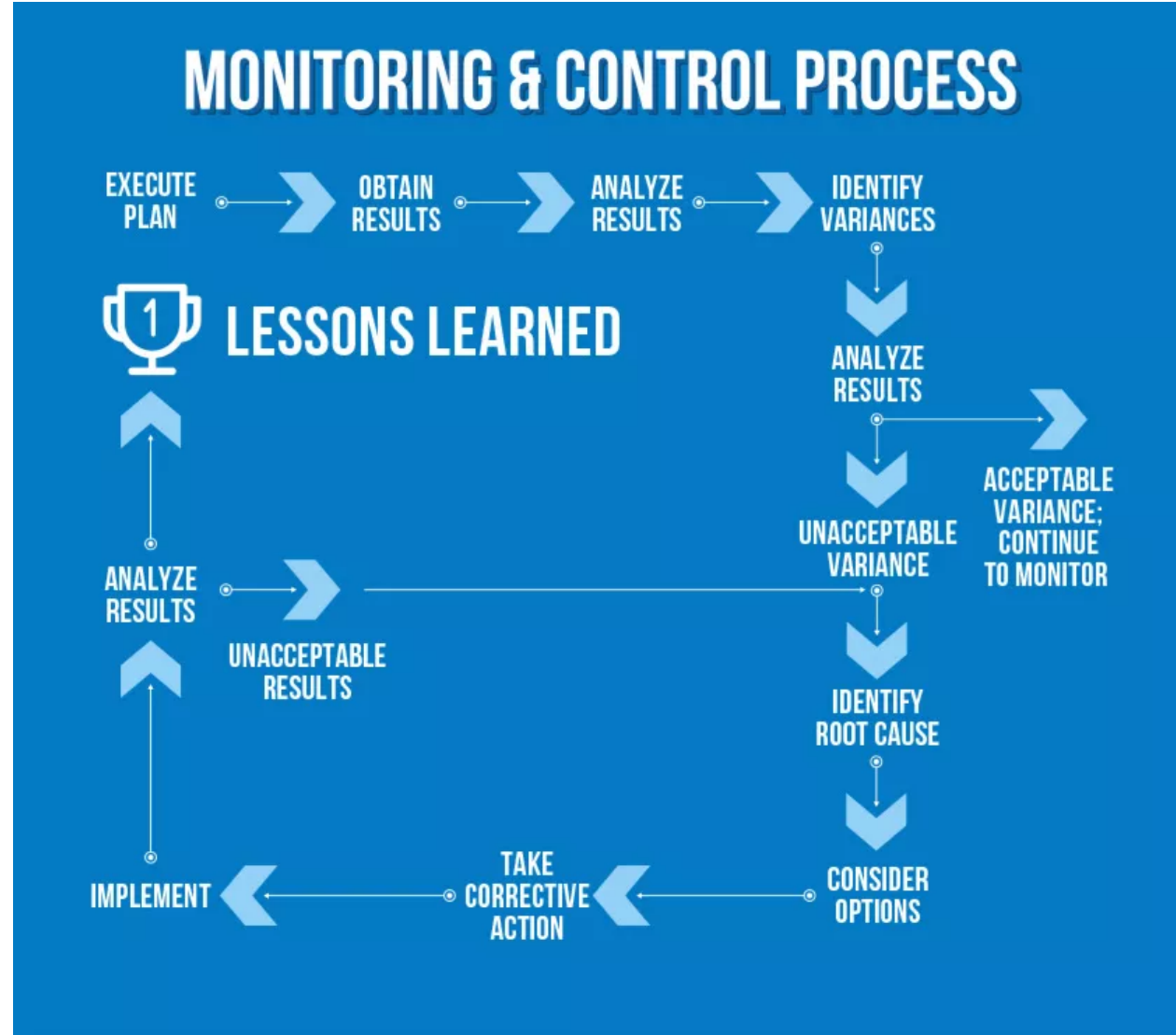
Project Managing

5 essential steps for project planning



Ricerca in azienda

Punti importanti da sapere: controllo continuo





Biotechnologie applicate

Plant Molecular Farming: Esempio di progetto

Sviluppo di un attivo per cosmetica

Esempio EGF

EGF: Epidermal growth factor – fattore di crescita dell'epidermide umano

IDEA: produrre questo growth factor tramite PMF come attivo per l'industria cosmetica

- 1) Ricerca di mercato e ricerca letteraria → esiste già questo attivo? Che efficacia potrebbe avere in ambito cosmetico? Chi lo produce e a che costo? È richiesto dal mercato? In che sistema è prodotto? Posso copiare il processo? Com'è fatta la proteina? Il progetto crea valore all'azienda?
- 2) Budget e tempistiche di progetto
- 3) Definizione del progetto
- 4) Creazione del vettore
- 5) Trasformazione della biomassa
- 6) Down-stream
- 7) Test di attività
- 8) Test di stabilità
- 9) Prima immissione in mercato

Sviluppo di un attivo per cosmetica

Esempio EGF

1) Ricerca di mercato e ricerca letteraria

Esiste già questo attivo? SI e si chiama sh-Oligopeptide-1

Che efficacia potrebbe avere in ambito cosmetico? Da articoli scientifici, l'EGF stimola la **proliferazione dei cheratinociti**, accelera la **rigenerazione della pelle**, favorisce la **riparazione dei tessuti**, può contribuire indirettamente alla **sintesi di collagene**

Chi lo produce e a che costo? Diversi fornitori nel mondo, è considerato un attivo High-tech di livello premium, quindi costoso

È richiesto dal mercato? SI, al momento i growth factor sono un trend

In che sistema è prodotto? Batteri e lieviti, un produttore in benthamiana e un produttore in orzo

Posso copiare il processo? Si, non è protetto da brevetto

Com'è fatta la proteina? 6 kDa, monomero, ponti disolfuro, no glicosilazione

Il progetto crea valore all'azienda? SI, valore commerciale

Sviluppo di un attivo per cosmetica

Esempio EGF

2) Budget e tempistiche di progetto

Voglio essere sul mercato in 1 anno visto che ci sono aziende che lo vendono già, con un budget relativamente basso (100-150 K euro)

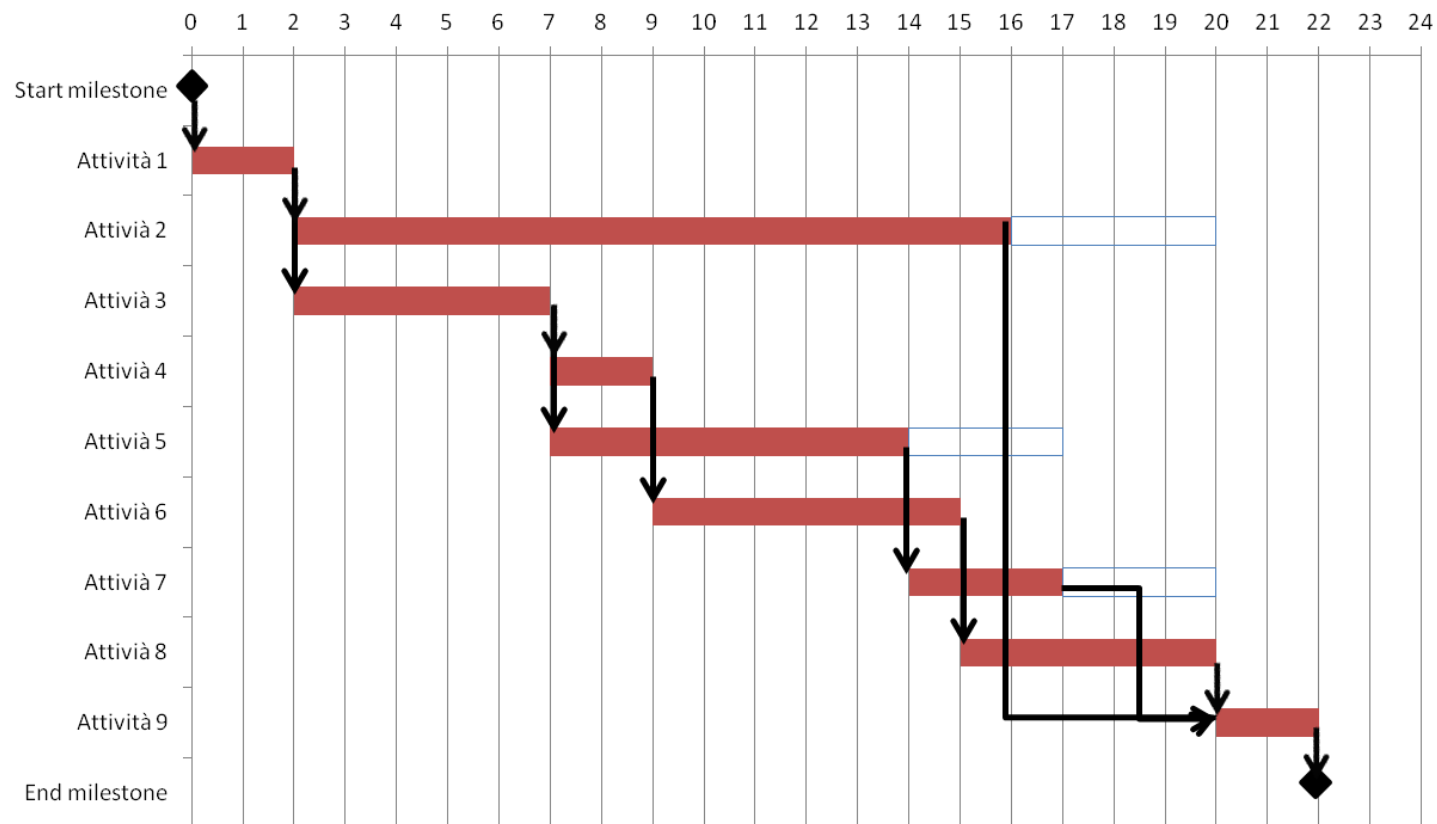


Necessità di espressione
veloce → trasformazione
transiente in benthamiana

Sviluppo di un attivo per cosmetica

Esempio EGF

3) Definizione del progetto



Richiesta finanziamento?

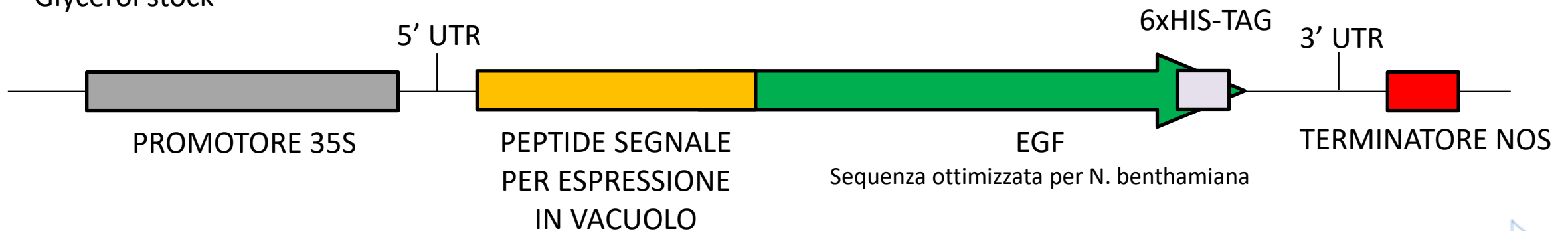
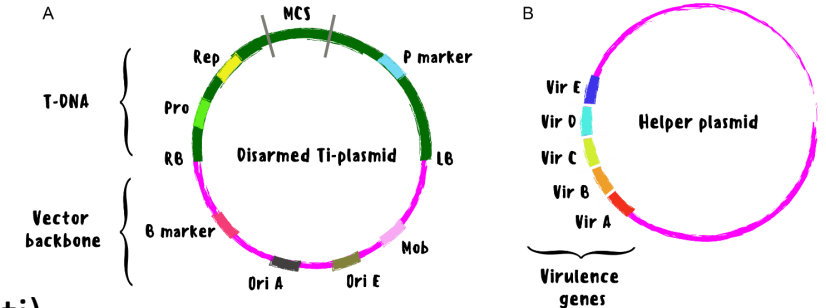
Sviluppo di un attivo per cosmetica

Esempio EGF

4) Creazione del vettore

Ho deciso di fare la trasformazione transiente in benthamiana quindi:

- Vettore adatto a questo tipo di trasformazione (eg pGreen)
- Gene di sintesi ed eventuali elementi della cassette di espressione (ordinati)
- Cassette di espressione con elementi per la benthamiana
- Primi clonaggi in E. coli e poi inserimento del vettore in A. tumefaciens
- Sequenziamenti
- Glycerol stock



E se ci metto la GFP? N o C term? O completamente slegata?

Sviluppo di un attivo per cosmetica

Esempio EGF

5) Trasformazione della biomassa

Crescita di *A. tumefaciens* con il vettore per EGF

Attivazione di *A. tumefaciens* con acetosiringone

Infiltrazione a vuoto delle foglie di benthamiana

In fase esplorativa: raccolta di campioni a DPI diversi per identificare il picco d'espressione

In fase di produzione: raccolta a tempistica predefinita



Se ho messo GFP potrei seguire
l'espressione della proteina tramite
fluorescenza

Sviluppo di un attivo per cosmetica

Esempio EGF

6) Down-stream

In fase esplorativa: ottimizzazione di ogni passaggio

In fase produttiva: processo predefinito

Ha senso? Prodotto più puro ma processo più costoso → ne vale la pena nel mercato cosmetico?



ESTRAZIONE



CHIARIFICAZIONE E
CONCENTRAZIONE

Capturing con resina per HIS

- Isolamento della proteina di interesse
- Riduzione drastica del volume
- >98% di proteina di interesse
- Scopo: concentrare e purificare la proteina di interesse

CROMATOGRAFIA

Se ho messo GFP potrei doverla togliere dopo la fase di capturing

Polishing con Size exclusion

- Eliminazione dimeri e altri aggregati
- Eliminazione forme tronche o glicoforme indesiderate
- Scopo: prodotto omogeneo

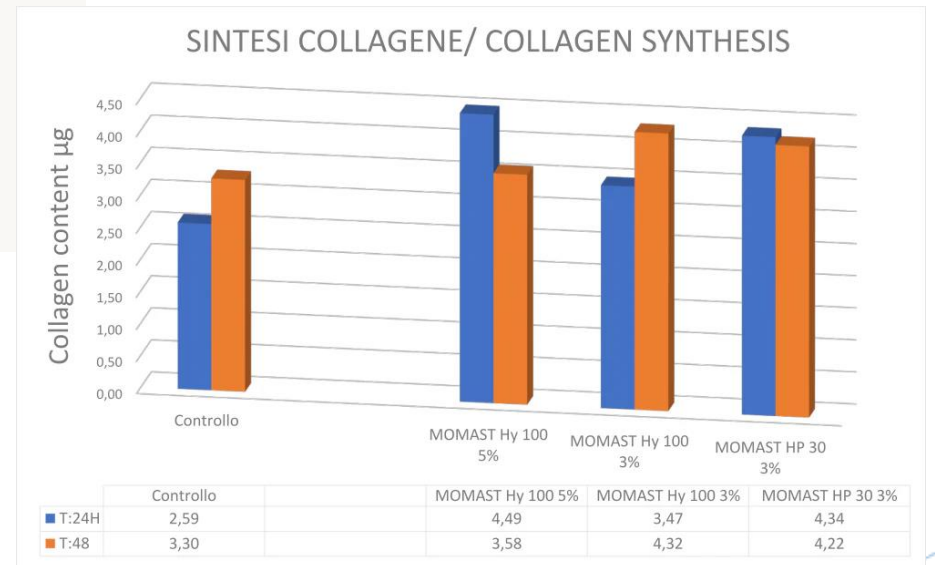
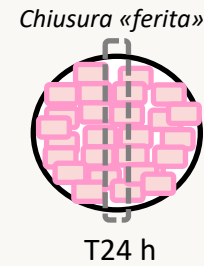


CAMBIO BUFFER

Sviluppo di un attivo per cosmetica

Esempio EGF

7) Test di attività: In Vitro (eg wound healing su cellule endoteliali, sintesi di collagene su fibroblasti)



Sviluppo di un attivo per cosmetica

Esempio EGF

7) Test di attività: sicurezza (mercato cosmetico)

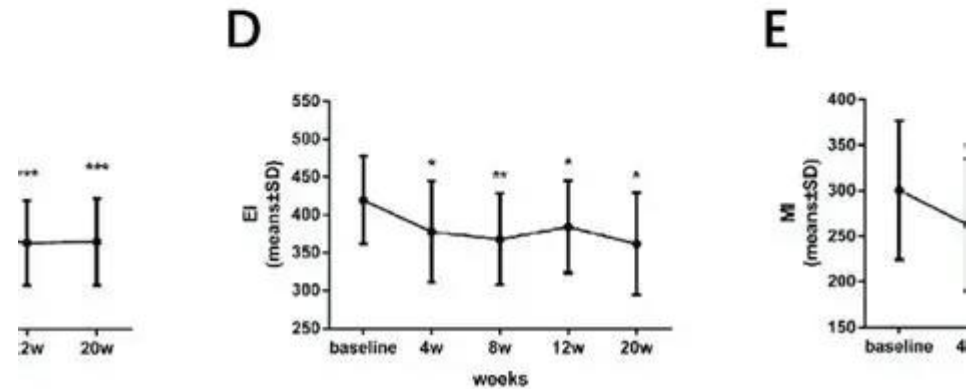
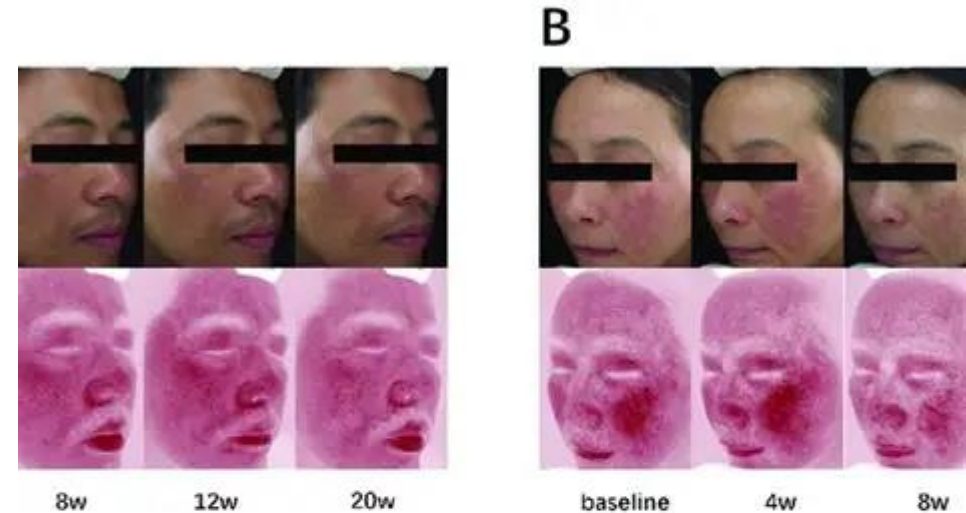
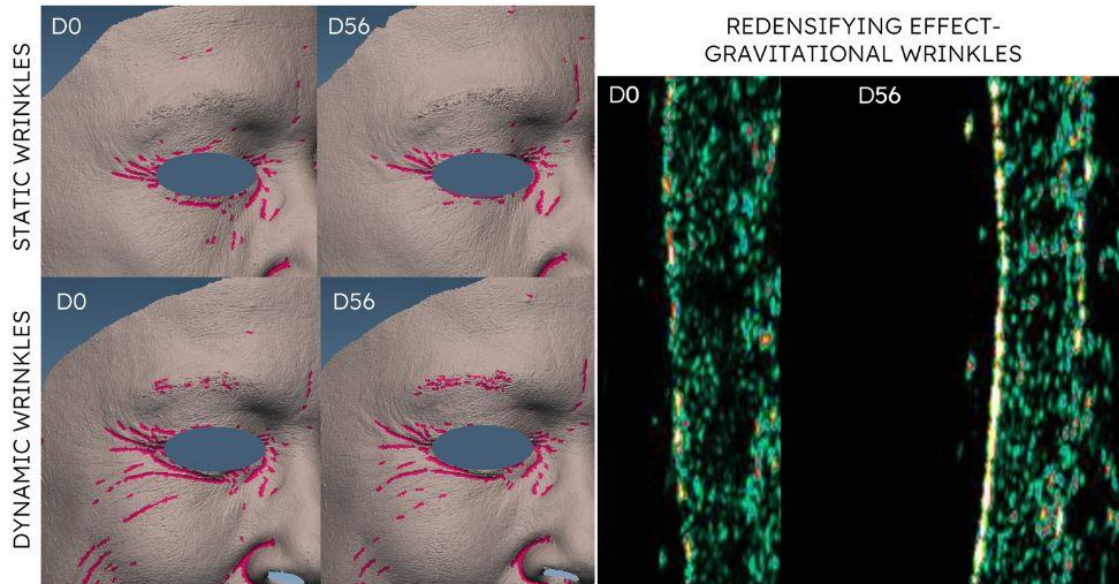
- **Protein structure**
- **Ingredient purity** by SDS-PAGE and Western Blo
- **Plasmid-DNA absence** by PCR
- **Allergens**
- **Heavy metals**
- **Nicotine**
- **Phototoxicity** (OECD 432)
- **Sensitizing potential** (OECD 442E)
- **Mutagenesis** (OECD 471)



Sviluppo di un attivo per cosmetica

Esempio EGF

7) Test di attività: In Vivo (eg anti-rughe, ridensificante derma)



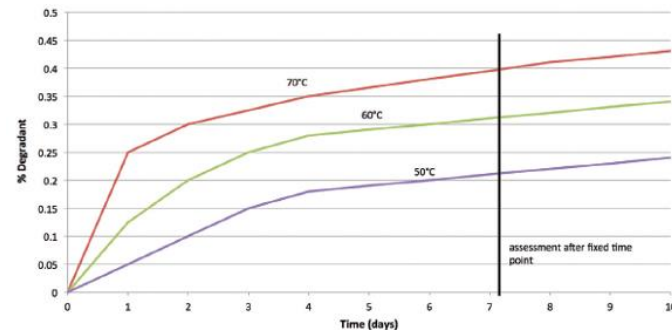
Sviluppo di un attivo per cosmetica

Esempio EGF

8) Test di stabilità e compatibilità

La proteina è stabile in soluzione? Va liofilizzata o stabilizzata con incapsulamento (eg liposomi)?
EGF è poco stabile in formato liquido a TA, meglio liofilizzarla o incapsularla

Stabilità TA e accelerata 40°C
(pH, colore, odore, separazione di fasi, attività)



Compatibilità con packaging primario (rilascio di molecole dal packaging al prodotto o viceversa, scolorimento packaging e stampe ecc)



Sviluppo di un attivo per cosmetica

Esempio EGF

9) Prima immissione in mercato

Calcolo prezzo di vendita = costo di produzione + guadagno
(meglio prezzo inizialmente basso per far conoscere il prodotto o prezzo alto per rientrare nei costi di ricerca?)

Piano di marketing → pubblicità, fiere, news letter, social, pubblicazioni ecc

Logistica e distribuzione



The sustainable future of drug development

DOMANDE?

**THANK YOU
FOR YOUR ATTENTION**

Mail to: cdeganutti@transactiva.it