RAPPORTO TECNICO IFT-CNR

Farmaci biosimilari da biotecnologie vegetali – Studio e sviluppo sperimentale di piattaforme vegetali per la realizzazione di innovative suite tecnologiche per la produzione di anticorpi monoclonali

Autori: Dott. Pasquale Pierimarchi[1], Dott. Giuseppe Nicotera[1], Dott. Gianluca Sferrazza[1],

1 Istituto di Farmacologia Traslazionale, Consiglio Nazionale delle Ricerche

Roma, 22/10/2019

Il Responsabile Scientifico CNR
Dott. Pasquale Pierimarchi

Abstract

Il programma di ricerca ha previsto lo studio e lo sviluppo sperimentale di un anticorpo monoclonale biosimilare prodotto presso la piattaforma di biotecnologie vegetali della Special Product's Line (SPL) di Anagni. Il progetto ha previsto la messa a punto del nuovo processo di produzione e la conseguente valutazione della biosimilarità mediante test di caratterizzazione strutturale, studi preclinici e clinici. La produzione di farmaci ricombinanti di proteine terapeutiche nei sistemi di produzione convenzionali che utilizzano batteri geneticamente modificati, lieviti o colture cellulari di mammifero, benché sia una metodica consolidata e alla base dello sviluppo di numerosi medicinali in commercio, presenta limitazioni correlate agli elevati costi da sostenere, alle basse rese e alla presenza di potenziali patogeni per l'uomo. L'innovazione tecnico-scientifica del progetto è basata su una tecnologia di avanguardia, la Plant Molecular Farming (PMF) ovvero l'utilizzo di piante ingegnerizzate per realizzare biomolecole a uso umano. La tecnologia è molto competitiva ma una volta completato, il polo biotech di Anagni, diventerà una realtà di eccellenza in questo settore di sviluppo industriale farmaceutico. Lo scenario scientifico e industriale del PMF ad altissimo valore aggiunto, si innesta infatti su metodologie di ricerca e di sperimentazione che rappresentano le premesse indispensabili per far crescere sia un capitale umano altamente specializzato sia per l'indotto farmaceutico e biotecnologico del nostro paese. L'obiettivo del programma e la grande innovatività del presente progetto consistono nell'ottenere farmaci biologici - (biosimilari e/o biobetter) - utilizzando piattaforme vegetali in suite tecnologiche modulari avanzate ed ecosostenibili a totale confinamento per la protezione dell'ambiente esterno, totalmente alternative a quelle ancora in vigore oggi, nate nei decenni passati con lo sviluppo delle biotecnologie ricombinanti su piattaforme tradizionali che utilizzano fermentatori e cellule di mammifero o microrganismi ricombinanti. La Piattaforma Vegetale che va sotto la denominazione PMF consente di ottenere i farmaci biosimilari più sicuri per i pazienti con effetti collaterali e immunogenici trascurabili, se non assenti, a costi molto competitivi.

Stato dell'arte

Un biosimilare è un farmaco che si sia dimostrato, da un punto di vista regolatorio, sovrapponibile a tutti i livelli, rispetto al farmaco biologico originator, secondo una procedura nota come comparability exercises. Poiché lo scopo principale del comparability exercise è identificare anche minime differenze tra il farmaco biosimilare e il rispettivo originator, gli studi non clinici e clinici richiesti devono essere caratterizzati da elevati standard metodologici soprattutto per quanto concerne il disegno, la conduzione, la scelta degli endpoint e/o la popolazione da trattare. L'European Medicines Agency (EMA), è stata la prima Agenzia ad aver emanato un quadro normativo di riferimento per i farmaci biosimilari, stipulando un processo di approvazione che segue una procedura graduale e dettagliata. In accordo a quanto riportato da EMA, l'estrapolazione dell'efficacia e sicurezza del biosimilare per le indicazioni non valutate nel corso del comparability exercise deve basarsi sulla globale evidenza di comparabilità tra i due prodotti. Pertanto, se la comparabilità tra i due farmaci è di tipo farmacodinamico, ma diversi meccanismi di azione giustificano l'efficacia in altre indicazioni terapeutiche, il richiedente dovrà fornire rilevanti dati a supporto dell'estrapolazione. Per alcune classi di farmaci biologici/biotecnologici, in particolare mAb impiegati nel trattamento di patologie neoplastiche, l'estrapolazione delle indicazioni risulta essere un processo piuttosto complesso, soprattutto alla luce del peculiare meccanismo di azione multi-target di tali farmaci. I farmaci biotecnologici e biosimilari per l'Italia e per l'Europa rappresentano dunque una sfida unica dal punto di vista dello sviluppo tecnologico ed industriale anche nell'ottica ed in funzione della scadenza dei brevetti su tali tipologie di farmaci che ad oggi fornisce un'occasione unica ed irripetibile di entrare nel mercato dei biosimilari in tempo per acquisire un buon livello di competitività di mercato e di innovazione tecnologica nel panorama farmaceutico internazionale.

Il mercato dei farmaci Biotech

Il mercato globale dei farmaci biotecnologici è stato valutato essere pari a 10 miliardi di dollari canadesi nel 1992 con una crescita pari a 390 miliardi di dollari canadesi nel 2014 e con un'aspettativa di crescita che si attesta intorno ai 595 miliardi nel 2019. Sulla base di tale proiezione di crescita, vi è il bisogno di creare soluzioni sostenibili per la produzione dei biosimilari al fine di rendere tali prodotti più accessibili e di fornire interessanti pipeline di prodotti creati partendo da starting materials di origine vegetale. Il mercato degli anticorpi monoclonali ha fatto registrare vendite pari a 115 miliardi di dollari canadesi nel 2015. Il segmento degli anticorpi monoclonali subirà un crescita nei prossimi anni con delle proiezioni di mercato pari a 185 miliardi di dollari canadesi entro il 2024. Lo sviluppo di nuove terapie biologiche ed in particolare per il trattamento delle neoplasie appare come uno dei mercati più floridi nell'ambito delle produzioni farmaceutiche globali. 7 delle "top 10 class drugs" nel 2016 appartenevano alla classe degli anticorpi per immunoterapia antitumorale e la vendita globale di questi dieci farmaci ha fatto registrare utili pari a 106 miliardi di dollari canadesi, dei quali oltre il 70% deriva dai proventi per i 7 farmaci biologici sopra-menzionati. Nel 2015 sono state registrate 183 biotech impegnate nello sviluppo di prodotti su oltre 190 diversi tipi di patologie**.** L'impiego di metodi di produzione basati sull'espressione delle proteine di interesse in piante transgeniche offre numerosi vantaggi rispetto

ad altri sistemi che vengono attualmente impiegati nella produzione di farmaci ricombinanti. I sistemi più comunemente impiegati sono basati sull'impiego di colture cellulari come le Chinese Hamster Ovary ("CHO"). Altri sistemi di produzione contemplano l'impiego di batteri, lieviti, cellule animali ed animali transgenici. Il vantaggio chiave dei sistemi vegetali risiede nell'abbattimento dei costi di manifattura, di allestimento delle facilities, sulle tempistiche di sviluppo e sulla flessibilità d'impiego di tali sistemi, nonostante vadano considerati a livello preliminare i processi downstream di purificazione che spesso comportano variabili difficilmente prevedibili e possono determinare un incremento dei costi per le procedure a valle del processo.

Anticorpi monoclonali prodotti mediante Plant Molecular Farming

Il processo di sviluppo degli anticorpi monoclonali e delle proteine farmacologiche sviluppate in bioreattori vegetali, offre illimitate possibilità seppur ad oggi ancora potenziali, per la produzione su vasta scala ed a basso costo di proteine ricombinanti, anticorpi e farmaci biologici in genere. La produzione di proteine derivate da organismi vegetali aiuterà a stimolare ed anticipare la domanda globale di farmaci biosimilari grazie ad un sostanziale abbattimento dei costi di sviluppo (e nello specifico di produzione), rendendo cosi molti farmaci che ad oggi presentano un prezzo troppo elevato, maggiormente "costo-sostenibili".

Table 1: Comparison of heterologous bioexpression systems.

Expression systems	Yeast	Insects	Mammalian cells	Plants
Production cost	Medium	Medium to high	High	Low
Maintaining cost	Cheap	Expensive	Expensive	Cheap
Protein yield	High	Medium to high	Medium to high	High
Gene size restriction	Unknown	Unknown	Limited	Not limited
Therapeutic risk	Unknown	Unknown	Yes	Unknown
Glycosylation	High mannose	Mannose terminal	Correct	Plant specific
Safety	Unknown	Medium	Medium	High
Time required	Medium	Medium	High	Medium

Molte produzioni tuttavia soffrono di problemi tecnologici da risolvere quali la bassa resa, la glicosilazione, la purificazione ed ulteriori ostacoli a valle del processo di lavorazione che hanno limitato lo sviluppo di farmaci PMF a livello clinico. Dal 2011 più di 20 farmaci PMF sono stati analizzati in esperimenti preclinici o in trials clinici. Diversi prodotti PMF hanno completato i trials di fase II ed un prodotto attualmente risulta approvato in FDA (Tabella 2). L'unica molecola sviluppata e commercializzata mediante piante modificate geneticamente è il farmaco Elelyso (taligluciferasi alpha - commercializzato dalla pfizer/protalix BIoterapeutics). Tale biosimilare del farmaco sviluppato dalla Genzyme è stato approvato per la vendita in FDA nel maggio del 2012. La Protalix che ha sviluppato Elelyso ha licenziato il prodotto alla Pfizer nel 2009 per 80 milioni di dollari canadesi oltre ad ulteriori milestones di finanziamenti per ulteriori 73 milioni ed un totale di 153 milioni di dollari canadesi. Questo prodotto è basato sull'impiego di cellule di carota opportunamente modificate per esprimere l'enzima ricombinante taliglucerasi aplha che è impiegato come terapia enzimatica sostitutiva per trattare pazienti adulti affetti da sindrome di Gaucher.

Company	Indicazione	Classe terapeutico-farmacologica	Starting materials vegetale	Status regolatorio
Pfizer/Protalix	Malattia di Gaucher	Proteina terapeutica	Cellule vegetali in coltura	Approvato FDA
Medicago	H5N1 Influenza aviaria	Vaccino	Tabacco	fase III
MAPP	Ebola	anticorpo	Tabacco	Accesso speciale per pandemia- approvato
Planet biotechnology	Carie dentali	anticorpo	Tabacco	fase II
Ventria Bioscience	Antibiotico antidiarrea	Proteina	Riso	fase II
Icon Genetics	Linfoma non-Hogking	Vaccino anti-idiotipo	Tabacco	fase I
iBio	Vaccino influenzale	Vaccino	Tabacco	fase I
PlantForm®	carcinoma mamamrio	Anticorpo	Tabacco	Preclinica
Plantigen	Diabete	Farmaco terapeutico	Varie specie	Preclinica

Tabella 2. Farmaci sperimentali e approvati sviluppati mediante Plant Molecular Farming

Le attuali sfide del settore PMF

I metodi correnti che vengono impiegati nelle piante per l'espressione di proteine d'interesse, non consentono di effettuare un controllo preciso sul livello di espressione del transgene nelle piante in maniera consistente e non tutte le specie di piante sono adatte a tali scopi. Ciò implica che la quantità di farmaco prodotto può variare in ogni specie vegetale o differire in ragione delle parti della pianta (foglie, frutti, semi). Mentre la scienza PMF è relativamente nuova, i sistemi di espressione in cellule e lieviti viene effettuato da oltre 30 anni e le industrie hanno sviluppato standard stringenti per tali metodologie di produzione e processi di purificazione ad elevata resa. Al contrario i protocolli per la purificazione di principi attivi derivati da PMF allo stato attuale variano tra loro a seconda della matrice/principio attivo impiegate/prodotto. Pertanto ogni tipologia di piattaforma PMF richiede il suo specifico protocollo di purificazione che dipende dalla

matrice di partenza e dalla tipologia di principio attivo prodotto. Fattori quali i composti fenolici derivati da piante, i patogeni delle piante, metaboliti secondarti, pesticidi e fertilizzanti incrementano ulteriormente la difficoltà di purificare un prodotto PMF a livello industriale. Le piattaforme PMF che prevedono l'impiego di mais o riso presentano problemi di contaminazione da polline che implicano problemi di biosafety poiché tali pollini possono contaminare piante non trasgeniche coltivate a scopo agricolo ed alimentare classico. Attualmente la FDA ha ristretto le policy per l'impiego di specie vegetali per la produzione di componenti farmaceutici ricombinanti.
Esistono linee guida concernenti la produzione di tali tipologie di medicinali partendo da starting materials di diversa natura. Le attività richieste ad una ditta di produzione di farmaceutici che produce piccole molecole generiche sono stabilite e ben conosciute. Il processo per stabilire degli standard regolatori per l'approvazione di biosimilari è stata ben stabilita in Canada, Europa, USA ed in altri domini. Nel 2005 EMA ha erogato specifiche linee guida per prodotti biosimilari incluse proteine ricombinanti ed anticorpi monoclonali come principi attivi. Tali linee guida includono tutti i principi e le regole generali su quality non clinica e clinica. Inoltre forniscono dei pathway per l'immissione in commercio per i prodotti che la company intende sviluppare. Tuttavia si evidenzia una importante mancanza di standardizzazione a livello di framework regolatorio EMA/FDA, riguardo l'impiego di piante transgeniche e lo sviluppo di anticorpi partendo da starting materials di origine vegetale.

Le piattaforme di produzione delle PMF ed i differenti tipi di espressione genica: transiente e stabile

Esistono due tipologie differenti di protocolli di espressione genica nelle piante che sono denominati stabile o transiente. La prima tipologia è caratterizzata da un protocollo di espressione che prevede una trasformazione genetica irreversibile, mediante l'impiego di uno specifico vettore ovvero e il bombardamento particellare (effettuati con metodi fisici e biologici rispettivamente) che inducono la penetrazione del cDNA codificante sia per la catena pesante e leggera degli anticorpi, direttamente nelle cellule della pianta e consente un espressione stabile del cDNA nel genoma. Le catene pesanti e leggere dell'anticorpo possono essere introdotte separatamente nella singola pianta. Le piante che esprimono elevati livelli sia delle catene pesanti che leggere dell'anticorpo vengono a loro volta incrociate per la generazione di linee transgeniche che esprimono entrambe le catene anticorpali. Tale approccio può essere impiegato per l'espressione multipla di anticorpi ed antigeni, anche inserendo siti di glicosilazione umanizzati nel genoma del cloroplasto. Molti vantaggi possono essere ottenuti dalla trasformazione a livello del cloroplasto inclusa l'impossibilità di produrre polline transgenico potenzialmente contaminante (grazie alla mancanza di plastidi nel polline maturo) el'ottenimento di elevati livelli di espressione con genomi altamente poliploidi. Pertanto un elevato numero di plastidi che trasportano numerose copie del transgene possono coesistere in una cellula e consentire un'elevata espressione a livello del cloroplasto fino al 25% delle proteine solubili totali. Inoltre, a livello del cloroplasto non avvengono fenomeni di effetto posizione (cambiamento nell'espressione fenotipica di uno o più geni a causa di un cambiamento di posizione degli stessi nel genoma) o fenomeni di silencing genico. Pertanto se la glicosilazione richiesta viene potenzialmente generata

a livello di tali strutture il cloroplasto può rappresentare un potenziale sistema di espressione stabile per la produzione di anticorpi monoclonali e proteine umanizzate.

Piattaforme ad espressione transiente

L'agroinfiltrazione (infezione delle foglie e degli steli mediante iniezioni con *Agrobacterium Tumefaciens*) e l'impiego di virus per il trasferimento di DNA ricombinate vengono invece adottati come sistemi transienti di espressione per anticorpi e proteine. Tale metodica è stata efficacemente integrata per siti di glicosilazione multipli che riproducono quasi fedelmente i residui di glicosilazione delle glicoproteine umane. I vettori virali vegetali possono essere impiegati per l'espressione transiente di anticorpi più rapidamernte rispetto al tempo richiesto per lo sviluppo vegetativo dell'intera pianta transgenica. Pertanto i vettori virali possono essere inoculati rapidamente per indurre l'espressione di anticorpi a singola catena (scFv) "customizzati in modalità paziente-specifica". Inoltre è stato possibile indurre l'epressione di anticorpi interi su tabacco mediante infezioni con il virus del mosaico del tabacco che è in grado di trasportare con se sia la catena leggera che pesante dell'anticorpo. Tuttavia i sistemi virali vegetali richiedono l'inoculazione del virus a livello delle foglie o degli steli di volta in volta a seguito appunto dell'espressione transiente, che comporta una frequente mutazione genica che avviene durante la replicazione del virus, diversamente da quanto avviene nei sistemi transgenici di espressione stabile. Pertanto la scelta della tecnica di espressione genica più idonea dipende dalla tipologia di prodotto che si intende sviluppare e dalle condizioni tecnologiche disponibili che impattano sensibilmente su tutte le fasi di processo. Tale tecnologia spesso richiede da sei mesi ad un anno per produrre piante transgeniche. Diverse generazioni di piante sono richieste al fine di produrre piante omozigoti per il transgene d'intesresse. Molte tecnologie di trasformazione, inoltre, determinano che il gene venga inserito in modalità random nel genoma della pianta. Il fattore dell'inserzione random in aggiunta alla necessita di identificare elementi regolatori (promotori) per condurre un elevato livello di espressione del gene d'interesse spesso risulta in una bassa resa della proteina ricombinante anche in piante che sono state stabilmente trasformate. Il tempo necessario per utilizzare un approccio PMF standard non risulta pertanto utile per venire incontro ad eventuali epidemie come quella dell' ebola la SARS o la MERS-CoV. Diversi vettori virali sono stati sviluppati per la produzione su piccola/media scala. Ad esempio Mason et al., ha sviluppato un sistema ad alta efficienza basato su un sistema virale (virus del nanismo giallo del fagiolo) adottando un replicone di DNA a singolo vettore che incorpora cassette di repliconi multipli di DNA. Il gruppo di ricerca è stato in grado di produrre 0,5 mg di anticorpo per grammo di foglia fresca in foglie di tabacco entro 4 giorni a seguito dell'inserzione. Mapp Biopharmaceutical impiegando una tecnologia simile è stata in grado di produrre l'anticorpo umanizzato MB-003 e ZMab in foglie di tabacco. MB-003 e ZMab sono stati in seguito combinati e strutturati per produrre il farmaco ZMapp. L'ìmpiego di questi anticorpi come farmaci è stato in grado di curare il 100% dei primati infetti. Tuttavia l'infiltrazione dell'agrobacterioum nelle foglie per l'espressione transiente del principio attivo d'interesse richiede un intensivo processo di controllo e lavorazione ed ha rappresentato il principale motivo per il quale le scorte di vaccino ZMapp non erano sufficienti al tempo dell'epidemia. Nel settembre 2014 il dipartimento per la salute ed i servizi umani (HHS) ha finanziato 42,2 milioni alla Mapp Biopharmaceutical Inc. per sviluppare un metodo

per la produzione su vasta scala. Con ulteriori ottimizzazioni del sistema ad espressione transiente la produzione su vasta scala ed in periodi brevi (una settimana) sta diventando un approccio possibile e di successo.

Piattaforme basate su bioreattori vegetali

Sistemi di colture cellulari vegetali

I sistemi che impiegano bioreattori a base di colture cellulari vegetali attualmente si stanno dimostrando maggiormente promettenti rispetto ai sistemi tradizionali che prevedono l'impiego dell'intera pianta per produrre principi attivi per ovvie ragioni di semplificazione dei processi di estrazione e purificazione a valle e per una maggiore similitudine rispetto ai sistemi tradizionali consolidati che prevedono l'impiego di bioreattori. In maniera simile ai bioreattori basati su microbi o cellule di mammifero le cellule vegetali sono messe in coltura in sistemi di bioreattori senza contaminazioni da parte di patogeni umani o contaminazioni dal suolo. Inoltre i problemi di biosafety associati alla distribuzione involontaria dei pollini e la cross-fertilizzazione sono anch'essi eliminati. Le colture di cellule vegetali richiedono solo nutrienti semplici per la crescita e pertanto il costo operativo è meno dispendioso rispetto ai bioreattori basati su cellule animali o microbi. I processi di purificazione a valle ed il processing finale delle proteine ricombinanti risulta anch'esso meno complesso vita l'assenza di fibre vegetali complesse e la non necessaria analisi per la verifica di metaboliti secondari che riducono sensibilmente i costi di produzione. Come precedentemente sottolineato il primo medicinale approvato da FDA basato su tecnologia PMF, ovvero la taliglucerasi alfa impiegata per il trattamento della malattia di Gaucher è stato prodotto in una sospensione di cellule di carota. Poiché tale patologia è estremamente rara il trattamento di tale patologia risulta particolarmente dispendioso (circa 200k dollari per anno per paziente). Impiegando il sistema di produzione su cellule di carota si ottiene un abbattimento dei costi di circa 50k dollari per paziente per anno. Più di venti proteine ricombinanti sono state prodotte a partire da sistemi di colture cellulari vegetali. Le specie di tabacco BY-2 e NT-1 sono le specie di piante maggiormente impiegate per l'impiego in bioreattori vegetali. La proteina ricombinante può essere espressa e secreta nel medium di coltura per semplificare i processi di purificazione a valle. Tuttavia la dimensione dei pori della parete vegetale può impedire la secrezione di proteine estranee in ragione della loro architettura ovvero le dimensioni e ripiegamenti. L'attività proteolitica nelle cellule in coltura può inoltre ridurre la resa sulla produzione finale di anticorpi. Magy et al. hanno dimostrato che il profilo proteolitico dipende essenzialmente dalla tipologia di specie vegetale impiegata. Questo team di ricerca ha testato la combinazione degli isotipi, le condizioni di coltura e le specie ospiti, identificando le migliori combinazioni che hanno consentito un incremento di 10 volte sui livelli di espressione (Più di 30 mg/L di anticorpo intatto sono stati prodotti in condizioni ottimali). Una resa di 20 mg/L dell'anticorpo monoclonale umano M12 è stato prodotto in colture di tabacco BY-2 in un bioreattore da 200 Litri.

Colture di muschi

Attualmente è stato valutato l'impiego di tali tipologie di colture prive semi come potenziale impiego per la produzione di proteine in bioreattori. L'abilità delle cellule di muschio di effettuare la fotosintesi in coltura riduce significativamente il costo per i nutrienti da coltura. Cosi come per le colture di lieviti e di cellule vegetali in sospensione le proteine ricombinanti possono essere disegnate per essere secrete nel medium di colture cellulari di muschi che può ridurre i processi a valle e semplificare i processi di purificazione della proteina ricombinante. Impiegando la manipolazione genetica le cellule di muschio possono produrre anche forme umanizzate di proteine come la lewis Y-specific mAb MB314, che riduce gli aspetti riguardanti la glicosilazione pianta-specifica. Alcune proteine ricombinanti terapeutiche come l'Epidermal Growth Factor, l'alpha galattosidasi , l'alpha amilasi e la versione glico-ottimizzata dell'anticorpo IGN311, (una proteina di fusione multi-epitopo derivata dal virus dell'immunodeficienza) et al., sono stati prodotti in sistemi di colture di muschio. Le colture di muschio della specie *Physcomitrella patens* sono le più comunemente impiegate nella produzione di proteine in bioreattori. Una Company Tedesca (Greenovation Biotech GmbH), ha sviluppato una piattaforma basata su tali specie di muschi per la produzione su vasta scala di proteine ricombinanti. Esempi di tali sviluppi includono la Moss-GAA per il trattamento della malattia di Pompe, Moss-GBA per la malattia di Gaucher e Moss-AGAL per il trattamento della malattia di Fabry. Quest'ultimo in particolare ha completato le fasi di sviluppo preclinico e sta entrando nelle sperimentazioni di fase 1 sull'uomo.

Bioreattori algali

Le colture di microalghe sono state impiegate efficientemente per la produzione di biocarburanti e proteine da diversi anni. Le microalghe presentano una struttura estremamente semplice e possono essere unicellulari, colonie o microfilamenti. Le alghe possono produrre grandi quantità di biomassa in brevi periodi grazie ai loro cicli vitali estremamente brevi. I processi di purificazione delle proteine ricombinanti nelle alghe è simile a quello che avviene nei lieviti e nei sistemi che sfruttano batteri e pertanto risulta meno costoso rispetto ai sistemi di produzione che sfruttano l'intera pianta. Tuttavia le proteine ricombinanti prodotte dalle alghe non vanno incontro a modifiche post traslazionali e pertanto non sono idonee alla produzione di alcune tipologie di glicoproteine. Per esempio non è possibile produrre da alghe forme umanizzate di proteine glicosilate a causa dell'assenza dei meccanismi enzimatici coinvolti in tali processi. Tuttavia è possibile produrre un serie di proteine ricombinanti diagnostiche e terapeutiche inclusi vaccini, enzimi ed anticorpi. In alcuni casi tuttavia i geni estranei sono solo espressi in maniera transiente nelle alghe. L'espressione stabile ed efficiente di geni estranei nelle alghe può essere incrementato sensibilmente impiegando promotori forti, l'impiego corretto dei codoni di replicazione, l'integrazione degli introni e specifici metodi di trasformazione. Un sistema di produzione basato su microalghe è stato sviluppato da una comany americana che produce bioreattori (PhycoBiologics). La resa di proteine ricombinanti da microalghe sopra il 20% rispetto alla proteina solubile totale è stata ottenuta dalle piattaforme che impiegano alghe rendendo queste ultime un approccio promettente per la produzione di principi attivi.

Piattaforme basate su semi

La stabilità delle proteine prodotte è un fattore fondamentale nello stoccaggio e conservazione dei prodotti ricombinanti a partire da PMF. Attualmente, molte proteine farmacologiche sono sintetizzate in piante fogliose per incrementare la resa. Le proteine ottenute da foglie tuttavia sono soggette a rapida degradazione proteolitica dopo che vengono raccolte. Lo stoccaggio a lungo termine del materiale vegetale non trasformato rappresenta un'importante step critico di processo in tale settore. L'over-espressione di proteine estranee nelle cellule delle foglie può causare necrosi delle matrici vegetali e morte cellulare. Esperienze preliminari di gruppi di ricerca indipendenti, hanno dimostrato che l'espressione transiente di varie proteasi nelle foglie induce necrosi dopo solo quattro giorni dall'infiltrazione. Tuttavia quando tali proteine sono targhettate per l'espressione a livello del seme, la necrosi cellulare non avviene, pertanto il target specifico di espressione a livello delle seme sta diventano un'alternativa valida per tali tipologie di produzioni. I sistemi basati sull'impiego di semi per PMF sono stati sviluppati a partire da varie specie di piante inclusa Arabidopsis, tabacco, riso e mais. le proteine ricombinanti targhettate al seme hanno dimostrato un accumulo ad elevata resa. Sono stati targhettati differenti compartimenti subcellulari per l'espressione proteica al fine di incrementare la stabilità delle proteine nel seme. Il compartimento del reticolo endoplasmatico (RE) nelle cellule vegetali è stato dimostrato che contiene bassi livelli di proteasi e pertanto rappresenta un environment protettivo per le matrici proteiche. La ritenzione di proteine da parte del RE pertanto incrementa la stabilità proteica e consente di evitare la perdita a seguito della degradazione. KDEL un peptide segnale dell RE è stato impiegato per targhettare la deposizione di proteine ricombinanti a livello del RE. Le proteine ricombinanti targhettare ai semi hanno cosi consentito tempi di stoccaggio più lunghi (fino a tre anni) a temperatura ambiente senza apprezzabili perdite di attività. Il target specifico di espressione delle proteine di interesse a livello del seme pertanto può consentire il prolungamento dei tempi di stabilita delle proteine cosi come migliori processi di raccolta stoccaggio e trasporto. Rispetto alle foglie i semi consentono la produzione di minori quantità di proteine e minori quantità di composti fenolici e metaboliti secondari. I semi sono facili da purificare e sterelizzare e tali aspetti ne facilitano anche la produzione su scala commerciale.

Glicosilazione umanizzata in piante per prodotti "glycan-better".

Oltre il 50% delle proteine umane sono glicosilate ed un terzo di tutti i prodotti biologici approvati sono glicoproteine. Le piante presentano vantaggi per la produzione di proteine grazie alla loro capacità di effettuare diverse modificazioni post-traslazionali inclusi i processi di glicosilazione e l'addizione di gruppi lipidici. La glicosilazione delle proteine native da piante e essenziale per il loro corretto funzionamento durante la crescita e lo sviluppo delle specie vegetali. Le piante e le specie animali condividono pathways di glicosilazione simili negli stadi precoci. Tuttavia negli stadi successivi di espressione proteica si formano specifici siti di glicosilazione tipici delle specie vegetali che possono indurre reazioni di immunogenicità nell'uomo. Nelle piante in particolare esistono 4 tipologie di N-glicosilazione: degli oligomannosi, complessa, ibrida e paucimannosica (contenente pochi residui di mannosio). Tutti questi glicani condividono una struttura core comune (Man3, GlcNac2) dove i residui addizionali di zuccheri legati includono un beta-1,2 xilosio ed un alfa-1,3 fruttosio che sono considerati epitopi allergenici che inducono una reazione IgE

mediata nell'uomo. Inoltre le piante non possiedono residui di acido sialico sulle loro strutture glicosilate che risulta stabile per la stabilità delle glicoproteine stesse. In natura dopo che le proteine entrano a livello del reticolo endoplasmatico mediante un peptide di segnale, esse vengono assemblate e ripiegate e le proteine glicosilate ed N-glicosilate vengono secrete all'esterno passando attraverso il complesso del Golgi nelle cellule vegetali. Le proteine terapeutiche sono principalmente N-glicosilate e pertanto le strutture glicosilate possono determinare problemi di stabilità, di ripiegamento e di attività biologica. La glicosilazione agisce in modalità diretta pertanto sulle caratteristiche biologiche , inclusa l'immunogenicità, l'allogenicità e l'interazione tra ligandi e recettori proteici. L'immunizzazione di topi e ratti con perossidasi di rafano stimola la produzione di anticorpi specifici per i glicani vegetali contenuti nella perossidasi. L'immunizzazione di conigli con un anticorpo monoclonale umano derivato da piante in esperimenti preliminari ha fatto registrare una massiva risposta immune ad un specifico sito di glicosilazione vegetale. La risposta immune verso siti di glicosilazione in seguito a modifiche post-traslazionali della pianta è un aspetto fortemente critico che può limitare fortemente l'approvazione di un PMF. Pochissimi trials clinici hanno indagato le ragioni per le quali le proteine ricombinanti a partire da matrici vegetali possono innescare risposte immunogeniche nei pazienti nonostante sia stato stimato che almeno il 20% dei pazienti sono potenzialmente sensibili a specifici N-glicani vegetali. Nonostante nessun trials clinico abbia rilevato un effetto avverso derivante da risposta immune ai glicani vegetali tale aspetto è ancora oggetto di dibattito ed ha fortemente ostacolato lo sviluppo di farmaci "PMF based". Numerosi gruppi di ricerca hanno adottato diverse strategie per evitare i problemi relativi a specifici siti di glicosilazione vegetali alterando il pathway che la pianta impiega per processare la proteina ricombinante d'interesse. In particolare le proteine ricombinanti sono state targhettate al reticolo endoplasamatico dove sono prodotti diversi residui glicosidici simili a quelli umani. Altri studi hanno provato a prevenire la produzione di residui di n-glicosidici impiegando geni knockout o silenziando specifiche sequenze con molecole anti-senso. Strasser et al. (2004) hanno prodotto un triplo knockout in *Arabidopsis* che ha consentito di ottenere proteine in assenza di residui di glicosilazione vegetali immunogeni e con siti di glicosilazione umanizzati. Un frammento anticorpale umanizzato ed un enzima attivo sono stati efficientemente prodotti mediante tali sistemi di glicosilazione controllata. Sono state anche sviluppate linee di RNA interference (RNAi) in tabacco e Lemna, al fine di downregolare l'espessione dei residui di glicosilazione vegetali immunogeni. Tutte queste linee di RNAi sono state in grado di produrre proteine umanizzate senza l'addizione di residui di glicosilazione pianta-specifici. Gli sforzi per ottimizzare i pathway di glicosilazione vegetali hanno incrementato fortemente la safety dei prodotti PMF e ridotto sostanzialmente le problematiche connesse a potenziali reazioni immunogene. La Protalix ha prodotto un "glycan-better" della taligluciferasi-alfa, per il trattamento della malattia di Gaucher. L'enzima è targhettato ai vacuoli delle cellule di carota. Diversamente dal prodotto equivalente prodotto in cellule animali CHO che esprimono una proteina ricombinante con un residuo sialico termiale che è necessario rimuovere mediante l'impiego di una esoglicosidasi al fine di esporre il residuo terminale di mannosio, l'enzima ricombinante prodotto in cellule di carota viene già sviluppato con il residuo terminale di mannosio esposto che è in grado di legare specificamente il recettore. La proteina ricombinante prodotta in cellule vegetali pertanto non richiede il processo di esposizione dei residui di mannosio

riducendo significativamente i costi di produzione ed i processi a valle e riducendo di fatto il costo di produzione e della terapia. Un altro esempio è rappresentato dalla produzione a partire da lenticchia d'acqua di un anticorpo (Biolex/Synthon, Durham, NC, USA). Le tecniche di RNA interference sono state efficientemente impiegate per ridurre il livello di enzimi coinvolti nella sintesi dei residui di glicosilazione . l'anticorpo cosi prodotto contiene un residuo n-glicanico maggiore che dimostra un'attività tossica cellulo-mediata di 20 volte superiore rispetto all'anticorpo originale e di 10 volte maggiore rispetto all'anticorpo prodotto secondo sistemi tradizionali in cellule animali CHO.

I processi di trasformazione a valle

L'estrazione e la purificazione di proteine derivate da PMF può essere estremamente complesso e costoso da un punto di vista di produzione industriale su vasta scala. È stato stimato che la purificazione ed i processi a valle rappresentano dal 80 al 90% del costo di produzione di farmaci mediante tecnologia PMF. Per ciascuna tipologia di piattaforma esistono protocolli differenziati di stoccaggio e di purificazione. Numerose metodologie in tal senso sono state sviluppate in maniera prodotto-specifica caso per caso. La company Kentucky Bioprocessing Inc. (Owensboro, KY, USA) ha sviluppato una piattaforma di espressione e produzione proteica in tabacco transgenico in modalità conforme alle attuali normative GMP. Healthgen BIotechnology Corp. (Wuhan, China) ha sviluppato un sistema basato su semi di riso chiamato OryzExpress, per la produzione di una varietà di prodotti come l'albumina ricombinante umana, l'antitripsina, inibitori delle proteasi, IGF-1 etc. Le sostanze di scarto delle matrici vegetali come le cere, i composti fenolici, i pigmenti, la lignina e le proteasi endogene ,sono ulteriori elementi critici nella matrice vegetale che creano problematiche nei processi a valle. Ad esempio l'ossidazione fenolica determina un'aggregazione e precipitazione delle proteine o le proteasi endogene possono causare fenomeni di proteolisi. La strategia efficace nei processi di trasformazione a valle deve consentire di rendere il sistema economicamente competitivo, robusto ed in compliance con le GMP. Nel 2015 **Caliber** Biotherapeutics ha sviluppato un facility basata su piante che possiede la capacità di processare oltre 3500 kg di biomassa di tabacco alla settimana. Un approccio di espressione transiente viene impiegato per la produzione di anticorpi "bio-better" ed anticorpi antivirali. I processi a valle del sistema in tale facility, includono un sistema automatizzato per la produzione di vari buffers impiegati per la separazione, cromatografia ad alta resa, e la formulazione (criostoccaggio). La resa totale con tali sistemi si aggira intorno al 62-68% delle proteine totali e la purezza del prodotto finito raggiunge livelli del 95-98%. Il costo per la produzione, purificazione e formulazione di prodotti PMF si è significativamente ridotto negli ultimi anni . ad esempio la produzione di vaccini derivati da piante per il trattamento dell'influenza stagionale costa da 0,10 a 0,12 dollari per una dose di 50 microgrammi di principio attivo.

Specie vegetali comunemente impiegate

Nonostante l'efficiente attività terapeutica degli anticorpi monoclonali, tali terapie non sono ancora applicate in maniera ottimale a causa degli elevati costi di produzione e delle potenziali contaminazioni con patogeni che infettano l'uomo e la limitata scalabilità industriale dei sistemi che prevedono l'impiego di cellule animali. Pertanto la ricerca di piattaforme di produzione

alternative che consentano una produzione costo-sostenibile, la sicurezza e la scalabilità, ha portato alla conduzione di numerosi studi sulle cellule vegetali. I sistemi vegetali come il tabacco le piante di alfaalfa ed altre sono state scelte poiché risultano essere fonti che sviluppano elevate quantità di biomassa. Il mais e la soya possono produrre ed accumulare anticorpi nei semi. Alcune specie vegetali hanno la capacità di produrre livelli relativamente consistenti di proteine solubili (si veda ad esempio il cavolo cinese per la produzione di proteine solubili. Il tabacco ha il maggior vantaggio rispetto ad altre specie di produrre elevata quantità di biomassa (soprattutto foglie) ed una rapida messa a dimora e tempi di crescita delle piante per la produzione. Ulteriori vantaggi derivanti dall'impiego della pianta di tabacco risiedono nel fatto che il tabacco non è una pianta né destinata al consumo alimentare umano nè animale e pertanto non vi è il rischio di contaminazioni con specie eventualmente destinate al consumo alimentare. Tuttavia occorre considerare anche che il tabacco contiene nicotina ed altri alcaloidi tossici che richiedono un opportuna rimozione mediante ulteriori processi di purificazione**.** Sia le foglie che i semi presentano vantaggi e svantaggi e. Le foglie con metabolismo attivo e complesso, presentano una quantità maggiore di proteasi endogene e pertanto risultano più suscettibili alla degradazione della proteina intra-matrice, determinando degli ovvi problemi di stabilità del prodotto in fase di stoccaggio e richiedono tempi di lavorazione della biomassa rapidi e tempestivi, onde evitare la degradazione degli anticorpi e/o proteine di interesse. I semi d'altro canto contengono un basso contenuto d'acqua e consentono un accumulo stabile nel tempo delle proteine d'interesse. Tuttavia essi richiedono un'elevata quantità di energia per la macinazione durante i processi di purificazione a valle. Pertanto nonostante l'estremo potenziale per la produzione di anticorpi monoclonali e proteine le piante nono sono sistemi perfetti per la produzione di biofarmaci.

Purificazione degli anticorpi ottenuti da piante

La purificazione di anticorpi espressi in piante viene effettuata generalmente impiegando la tecnica della cromatografia di affinità. Per la purificazione dei tessuti delle piante in genere occorre omogeneizzare le matrici per distruggere le pareti cellulari al fine di consentire il rilascio delle proteine d'interesse, l'eliminazione dei debris, delle sostanze chimiche nocive (nel caso del tabacco occorre eliminare gli alcaloidi presenti come la nicotina etc,.) ed eventuali contaminanti come pesticidi e diserbanti normalmente impiegati per le colture. Tali processi rappresentano le principali sfide nell'ambito del PMF principalmente a causa degli elevati volumi di produzione su vasta scala ed a causa dell'elevato costo delle colonne di purificazione ed inoltre i materiali eterogenei contenuti nella matrice vegetale spesso comportano problemi alle colonne di purificazione oltre l'elevato costo di tali componenti.

Vaccini Edibili

Un esempio di un ealry proof of concept per PMF riguarda la produzione di vaccini edibili impiegando piante o frutti. I vaccini edibili sono un prodotto ideale nel panorama generale delle vaccinazioni poiché consentono l'assunzione senza la supervisione e la somministrazione del clinico in centri specializzati con effetti facilmente deducibili sulla portata delle vaccinazioni totali e la compliance dei pazienti. Tale approccio consente inoltre di evitare di dover eliminare le matrici residue della pianta poiché vengono consumate in toto e di poter produrre tali specie a livello

locale riducendo i costi di trasporto e stoccaggio. Inoltre tali tipologie di farmaci edibili consentirebbero di evitare potenziali rischi di infezione per i pazienti poiché in genere gli organismi che causano le patologie nelle piante non sono in grado di infettare l'uomo. I primi vaccini edibili prodotti da Charles Arntzen e coll. sono stati prodotti a partire da piante di tabacco ed esperimenti preclinici su cavia, che valutavano il consumo di patate che esprimevano HBsAg, hanno fatto registrare una massiccia risposta immune nell'animale. Tale approccio è stato in seguito testato sull'uomo ed i risultati ottenuti hanno dimostrato in oltre il 60% dei pazienti un elevata risposta immune dopo tre somministrazioni del alimento geneticamente modificato. Tali risultati hanno aperto la strada a possibili strategie alternative di vaccinazione su vasta scala ed a costo contenuto. Allo stato attuale diversi vaccini ricombinanti sono stati sviluppati in diverse matrici vegetali quali lattuga, banane, pomodori ed in diverse tipologie di grano sono in indagine clinica e stanno facendo registrare risultati incoraggianti.

Vantaggi derivanti dall'impiego di tecnologie PMF

Un aspetto molto vantaggioso del PMF è che non richiedono ingenti investimenti per la conduzione degli studi preliminari. Le piante possono essere cresciute in greenhouse o eventualmente in laboratory di biosafety se richiesto. Il costo per il mantenimento delle piante per PMF è basso rispetto al costo medio per le tecniche originarie che prevedono l'impiego di batteri quali E. coli, l'impiego di lieviti o di cellule di mammifero come sistemi di espressione; inoltre le materie prime ovvero le parti della pianta per produrre proteine ricombinanti è potenzialmente illimitata. I sistemi di espressione su pianta presentano numerosi ulteriori vantaggi rispetto ai sistemi procarioti o eucarioti attualmente impiegati riguardo la velocità di produzione i costi e la safety. Le piante possono processare ed assemblare in maniera precisa proteine complesse come anticorpi secretori, immunoglobuline. L'impiego delle piante elemina anche potenziali rischi di contaminazione dei farmaci con patogeni animali che possono infettare l'uomo (prioni, virus, micoplasmi) incrementando gli attributi di safety dei prodotti. In generale il costo di un prodotto farmacologico PFM e solo dello 0,1% rispetto ai sistemi di impiego tradizionale basati su cellule e del 2-10% dei sistemi che contemplano l'impiego di microorganismi.

Le piante hanno il potenziale di produrre in tempi brevi proteine ricombinanti su vasta scala ed ad un costo relativamente basso rispetto ai sistemi tradizionali che contemplano l'impiego di cellule animali. I processi di purificazione a valle dei prodotti PMF risultano ancora difficoltosi ed ad elevato costo. L'identificazione dei geni candidati ideali, una importante richiesta di mercato, ed un buon sistema di produzione sono gli unici elementi in grado di creare un ponte solido tra la ricerca di base nel settore PMF e la sua concreta applicazione commerciale semplice e vantaggiosa, ma tuttavia problematiche riguardanti la biosafety, la salute umana (risposte immunogeniche a specifici residui di glicosilazione vegetali) ed altri fattori richiedono ancora ad oggi di essere adeguatamente messi a punto

Il progetto SPL ha una durata complessiva di 48 mesi ed ha realizzato nel primo anno di attività le attività propedeutiche a realizzare l'impianto produttivo, il processo di upstream, downstream e i test preliminari per la verifica della biosimilarità.
È stato identificato Il riso della varietà CRW3 come specie botanica di riferimento per la messa a punto del sistema di modifica genica finalizzato all'espressione dell'anticorpo in pianta. Sono state messe a punto delle sequenze codificanti la catena leggera e pesante dell'anticorpo in esame e la sintesi artificiale delle sequenze codificanti e loro clonazione. È stato sviluppato il design genico e dei codoni del nuovo anticorpo monoclonale mediante tecniche di biologia molecolare e l'espressione del biosimilare entro l'endosperma del seme. Le attività hanno consentito lo sviluppo di un vettore di espressione che produce un'alta espressione e una localizzazione specifica tissutale e subtissutale del mAB. La progettazione ottimale del sistema di coltivazione delle piante è stato pertanto il primo step del processo produttivo che si è caratterizzato da elevati standard di qualità al fine di supportare in modo razionale ed efficiente le successive attività sperimentali. In tale contesto sono state effettuate differenti prove di coltivazione mediante protocolli differenti al fine di identificare le condizioni sperimentali più idonee al raggiungimento degli obiettivi in riferimento alle Good Agricultural and Collection Practices. È stato effettuato lo studio e progettazione del conceptual design per tutte le suite tecnologiche modulari sia di coltivazione che di processo up/down stream, lo studio del basic design per le suite modulari di coltivazione per i mAbs innovativi, lo studio del basic design per le suite modulari per i processi di up e downstream e prove sperimentali su modello della Suite Biotech R&D di SPL già esistente.
Sono state messe a punto le metodiche sperimentali finalizzate a identificare le migliori condizioni per la coltivazione delle piante. Il riso della varietà selezionata CRW3 wild type è stato coltivato in idroponica e con luce artificiale prodotta da illuminatori LED. Il processo di coltivazione si è composto di diverse fasi che sono state ottimizzate nel corso delle diverse prove di coltivazione svolte. La germinabilità è risultata elevata in tutti gli esperimenti e le fasi di sviluppo vegetativo si sono completate in modo ottimale.
Le attività successive hanno invece previsto lo studio del processo di estrazione, purificazione ed isolamento dell'anticorpo in scala laboratorio e dei relativi controlli analitici ai fini della verifica della biosimilarità chimico-fisica. Sono state inizialmente sperimentate e identificate le condizioni ottimali per l'estrazione e purificazione dell'anticorpo di interesse da riso transgenico. La lavorazione della materia prima ha previsto diversi step quali: macinazione, utilizzo di tamponi, agitazione magnetica, centrifugazione e filtrazione. Sono state valutate due metodiche estrattive e l'influenza del pH, della forza ionica sull'estrazione e la stabilità del mAB. I risultati hanno dimostrato che l'estrazione permette di ottenere rese elevate dell'anticorpo. Successivamente è stato messo a punto il processo di purificazione su scala laboratorio e la definizione di uno step cromatografico per la cattura dell'anticorpo e di tre step cromatografici per la pulizia degli eluati contenenti il mAb da contaminanti vegetali estranei quali proteine, DNA, metaboliti secondari da pianta, contaminanti avventizi quali endotossine batteriche e batteri. Operando come descritto, sono state effettuate una serie di purificazioni da linee di riso per verificare robustezza e riproducibilità del processo. I cromatogrammi in HPLC SEC, relativi ai principali step di purificazione, mostrano l'arricchimento dell'anticorpo rispetto alle proteine totali con l'avanzare delle fasi di processo. La purezza dell'anticorpo in confronto all'originator è stata valutata anche in

HPLC RP e con analisi elettroforetica SDS Page. Il profilo elettroforetico è risultato molto simile sia nel numero delle bande maggioritarie e minoritarie che nella loro intensità. A seguito della messa a punto del processo di purificazione, è stato redatto un protocollo di caratterizzazione Chimico-fisico e funzionale e di Comparability rispetto al farmaco originator. La caratterizzazione consiste nella verifica della struttura primaria mediante la sequenza Aminoacidica ottenuta dopo digestione enzimatica (Peptide mapping) e sequenziamento dei peptidi mediante spettrometria di massa ed analisi MALDI/MS e MS/MS, nella caratterizzazione delle Glicoforme e identificazione delle strutture e dei residui glucidici sempre mediante analisi in spettrometria di massa, Glycan Profiling by MALDI/MS e MS/MS. Le attività di ricerca svolte hanno consentito la messa a punto dei processi di up e downstream in riferimento alla produzione del biosimilare su scala pilota definendo gli step sperimentali relativi al processo di produzione al fine di effettuare lo scale-up dalla scala pilota alla scala industriale e di definire lo sviluppo del processo di produzione del medicinale biosimilare.

Le linee di semi precedentemente identificati sono state pertanto coltivate per la costituzione della Seed Seed Bank (SSB) con successiva analisi di caratterizzazione completa della stessa. Nello specifico sono stati effettuati sia i test di sequenziamento del genoma che la conferma del sito d'inserzione nel genoma delle piante mediante analisi PCR. Come saggio immunologico è stato effettuato un DAS-ELISA al fine di valutare il contenuto di mAB in ogni estratto. Per tale analisi sono stati impiegati anticorpi diretti contro l'-Fc di del mAB. In tutti i diversi semi i livelli di concentrazione dell'anticorpo ricombinante riscontrati sono stati sufficientemente elevati e paragonabili confermando che la linea selezionata è stabile per l'espressione del mAB di interesse. Tutte le attività sono state sviluppate ed ottimizzate in modo tale da rispettare i requisiti indicati nella normativa di tracciabilità, confinamento per la protezione dell'ambiente esterno e idoneità del materiale dal punto di vista microbiologico per poter essere uno *Starting material* utilizzato per fini farmaceutici. Per la redazione di tale procedura è stata presa come riferimento la linea giuda EMEA/HMPC/246816/2005 *"Guideline on good agricultural and collection practice for starting materials of herbal origin"*.

A seguito della creazione della SSB, sono state avviate le attività per la creazione, conservazione di e caratterizzazione della MSB. La selezione della linea produttiva del riso transgenico è un processo multi step che comprende diverse generazioni (Tn). La tabella sottostante sintetizza gli step dello sviluppo della Master seed bank (MSB). Sono state condotte analisi morfometriche e morfologiche dimostrando l'assenza di variazioni in merito ai tratti qualitativi tra le 20 specie di campioni della linea selezionata. Sono state apprezzate lievi differenze nei tratti quantitativi delle due linee ma tali differenze non sono risultate statisticamente significative. Tutti i tratti morfologici e fisiologici sopra menzionati la linea transgenica e la linea di origine CR W3 sono risultate indistinguibili. Al fine di confermare l'espressione del mAB a livello tessuto specifico sono stati collezionati differenti porzioni vegetali dalle piante durante gli stadi vegetativo, riproduttivo e di maturazione. È stato condotto un test ELISA ha avuto come obiettivo la valutazione della concentrazione di anticorpo espresso nei vari estratti proteici ottenuti dai tessuti provenienti sia dalla specie wild type che dalla linea transgenica impiegando l'analisi a quattro parametri. I valori sono stati confrontati con la curva di calibrazione messa a punto utilizzando l'originator. I risultati dei test DAS-ELISA confermano l'espressione tessuto specifica del del mAB entro l'endosperma

della pianta rispetto alle altre strutture vegetali collezionate. Dopo aver selezionato la linea di riferimento, è stata prodotto un lotto di anticorpo. La produzione è stata eseguita in accordo ad un protocollo che consente di ottenere un livello qualitativo ben al di sopra dei requisiti richiesti per i test farmacologici preclinici ed idoneo anche per lo scale-up diretto in condizioni GMP. I campioni sono stati analizzati mediante SDS-PAGE per valutarne la purezza. I risultati ottenuti dai vari lotti di anticorpo prodotti in riso manifestano una purezza e una concentrazione simile a quella dell'originator. A seguito delle operazioni di purificazione dell'anticorpo, è stato messo a punto il lotto Reference per i test preclinici ed un lotto per la caratterizzazione chimico fisica del biosimilare. Il materiale ha superato il test di sterilità e pirogenicità ed è risultato idoneo per il suo utilizzo nei saggi in vitro e vivo.

Il processo sviluppato nella scala pilota è stato riprodotto in scala maggiore per verificare le riproducibilità e le rese produttive. I test effettuati hanno dimostrato che gli step sperimentali consentono di raggiungere gli obiettivi produttivi prestabiliti in termini di tempistiche e mg di anticorpo ottenuto. Il prodotto finale è stato sottoposto a controlli analitici per determinare il grado di purezza raggiunto anche confrontandolo con l'originator. In particolare sono stati effettuati controlli HPLC SEC, HPLC RP e SDS PAGE, per la determinazione della purezza, e la determinazione della concentrazione per via spettrofotometrica. L'analisi in HPLC SEC tra il bulk purificato e l'originator ha dimostrato che i i due cromatogrammi sono completamente sovrapponibili. Anche il profilo delle impurezze è risultato comparabile.

L'anticorpo ottenuto da tale processo è stato sottoposto a valutazioni in vitro per determinare la l'effetto farmacologico in comparazione con l'originator. I test in vitro condotti hanno previsto: analisi del legame degli anticorpi a linee cellulari di tumori; analisi dell'apoptosi indotta dagli anticorpi su 4 linee cellulari tumorali su 5 popolazioni di cellule primarie isolate da pazienti; analisi della citotossicità complemento-dipendente indotta dagli anticorpi su 4 linee e 5 popolazioni cellulari tratte da pazienti. I dati farmacologici ottenuti hanno confermato un elevato profilo di comparabilità tra l'originator commerciale ed il mAb ottenuto da riso.

Conclusioni

Le attività sperimentali condotte nella prima fase del progetto di realizzazione di un anticorpo biosimilare hanno consentito di ottenere importanti risultati per lo sviluppo di un processo d con caratteristiche tali da poter ipotizzare una produzione industriale dell'anticorpo. Nello specifico le attività progettuali hanno permesso di mettere a punto i protocolli di estrazione e purificazione dell'anticorpo, i metodi per analisi quantitativa e qualitativa, i protocolli di caratterizzazione chimico-fisico. Parallelamente sono state create la Seed Seed Bank e la Master Seed bank che saranno utilizzate per la produzione futura del mAb. Tali risultati si accompagnano alla creazione delle facilities nelle quali sarà effettuata la produzione dell'anticorpo nelle fasi successive di scale-up: p' stata effettuata la definizione e realizzazione in accordo alle normative e cGMPs delle suite tecnologiche modulari per i processi di upstream e di downstream con sviluppo dell'impiantistica per scale-up industriale. Il progetto ha un carattere innovativo e strategico per l'azienda che sta conducendo il programma R&D ma anche a livello globale per il mercato farmaceutico e per i servizi sanitari nazionali. I farmaci biologici ad oggi sono tra i prodotti maggiormente prescritti e venduti nell'ambito del trattamento di numerose patologie. Sono medicinali sono molto costosi e hanno un impatto importante sulla spesa farmaceutica del Sistema Sanitario. Vista la scadenza dei brevetti di numerosi prodotti biotech, il segmento di mercato di tali prodotti è destinato a crescere considerevolmente nel prossimo futuro, proponendo maggiori risorse economiche a vantaggio dei pazienti e dei sistemi sanitari. La produzione su scala industriale di anticorpi ricombinanti si basa essenzialmente sulla coltura in sterilità di cellule mammifere geneticamente trasformate all'interno di idonei bioreattori. Tale sistema presenta tuttavia numerose problematiche, (elevati costi di produzione e di gestione) e pertanto le Agenzie regolatorie auspicano lo sviluppo di sistemi alternativi per la produzione su larga scala. I potenziali benefici delle piante per la produzione di farmaci biotecnologici comprendono oltre ad una sensibile riduzione dei costi generali, una produzione altamente scalabile e rapida, un'assenza di rischio di contaminazione con patogeni umani e la capacità di eseguire molte delle modifiche post-traduzionali necessarie per la costituzione di proteine umane funzionali. La SPL di Anagni ha sviluppato negli ultimi due anni una conoscenza approfondita avendo dato vita ad un nuovo e avanzato polo Biotech in grado di produrre farmaci biotecnologici ed in particolare anticorpi monoclonali (mAbs) attraverso un processo profondamente innovativo basato sulle biotecnologie vegetali.

Pasquale Pierimarchi