

ABOUTPHARMA

AND MEDICAL DEVICES

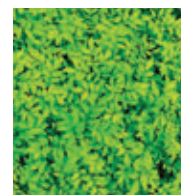
Legge Concorrenza

**Reazione a catena
anche nell'industria**



Good manufacturing practices
Fda e Ue si accordano
sulle ispezioni
pag. 32

Business
Le regole per investire
nei mercati emergenti
pag. 48



Medicina e ricerca
Ecco gli anticorpi
prodotti con le piante
pag. 78

SE A PRODURRE ANTICORPI CI PENSANO LE PIANTE

Organismi vegetali opportunamente ingegnerizzati sono in grado di replicare complesse biomolecole per uso umano. Una strategia che ha buone rese, tempi di produzione ridotti e costi minori rispetto ai sistemi di produzione attuali. Eppure – a parte pochi successi – la “rivoluzione verde” tarda ad esplodere

► **Cristina Tognaccini**
AboutPharma and Medical Devices
ctognaccini@aboutpharma.com

Se tutto va secondo i piani di Massimiliano Florio la prima azienda al mondo a produrre un anticorpo monoclonale a partire dalle piante potrebbe essere italiana. Laziale per la precisione. Nel 2014, l'azienda di cui Florio è amministratore delegato, Sosepharm, ha intrapreso un progetto con la Regione Lazio per la produzione di biosimilari tramite il “plant molecular farming”, ovvero l'utilizzo di piante ingegnerizzate per realizzare biomolecole a uso umano. “Analizzando il percorso di alcune aziende multinazionali americane che producevano vaccini a partire dalle piante del tabacco – racconta Florio, che è anche presidente della Special product's line – abbiamo attivato un percorso di caratterizzazione del riso per produrre il rituximab, anticorpo monoclonale utilizzato nel trattamento del linfoma non Hodgkin delle cellule B, nelle leucemie delle cellule B e in alcune malattie autoimmuni, la cui indicazione potrebbe essere estesa anche alla sclerosi multipla. Il progetto ha comportato una prima fase di ricerca e sviluppo presso il nostro stabilimento di Anagni, durante il quale

abbiamo messo a punto una serie di coltivazioni idroponiche e studi preclinici che una volta completati ci consentiranno di avviare le fasi cliniche. Ora siamo in attesa di ricevere l'autorizzazione da parte dell'Ema perché si possa operare in Gmp ed entrare nell'industrializzazione del processo per arrivare sul mercato entro cinque anni. L'idea poi permetterà in futuro di sfruttare la piattaforma vegetale per produrre anche altri biosimilari, con un impatto positivo anche sulla nostra spesa sanitaria. Il processo di produzione tramite piante transgeniche è infatti economicamente favorevole rispetto a quello attuale, anche perché viene fatto tutto 'in house'. Il prezzo del medicinale sarà remunerativo per l'azienda e allo stesso tempo per lo Stato”.

LA RIVOLUZIONE VERDE

È una vera e propria “rivoluzione verde” insomma quella a cui si potrebbe assistere se Big pharma iniziasse a produrre farmaceutici usando le piante come bioreattori, ovvero come se fossero fabbriche in miniatura. Il primo passo verso il nuovo approccio in realtà è stato mosso quasi trenta anni fa da diverse aziende e centri di ricerca, come

la nostra Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo sostenibile (Enea) che negli anni '90 fece quasi da apripista nel lavorare sui “plantibody”: anticorpi per uso umano prodotti tramite piante ingegnerizzate.

Il presupposto è che ormai molte delle cure di cui disponiamo oggi si basano su medicinali biotech come gli anticorpi monoclonali (Mab) prodotti da organismi cellulari e non per sintesi chimica. Prodotti rivoluzionari che hanno aperto nuove vie di trattamento per malattie difficili da curare, ma dal costo elevato, proprio per via della loro innovatività ma anche del sistema di produzione. Nonostante i primi brevetti siano scaduti già da alcuni anni, la spesa per un ciclo di terapia resta elevata e di conseguenza poco accessibile, soprattutto nei Paesi a basso reddito. Che fare quindi? Le piante possono dare una mano. In particolare, appunto, il “molecular farming” (agricoltura molecolare) che permette di ottenere anticorpi e altre sostanze terapeutiche come enzimi e vaccini, in modo semplice e a costi accessibili. L'utilizzo delle piante per produrre biomolecole utili all'uomo ha infatti “buone rese, tempi di produzione ridotti e costi minori”, spiega Eugenio



Benvenuto, responsabile del laboratorio di biotecnologie dell'Enea. Le piante inoltre sono anche prive di contaminanti potenzialmente patogeni per gli esseri umani, come endotossine, virus, prioni e batteri. Invece, i virus delle piante non infettano gli uomini, caratteristica che le porta a essere esenti dai rischi legati ai sistemi di produzione di origine animale.

UNA "FABBRICA VERDE"

Le "fabbriche verdi" vengono attivate grazie a opportuni vettori, modificati e resi innocui, che trasportano il gene in grado di esprimere la proteina desiderata. La pianta, quando viene "infettata" dal vettore, inizia a sintetizzare la nuova molecola per uso umano. E la resa è pressoché illimitata se si pensa che, una volta creata la prima pianta transgenica, basta coltivarne quante ne servono per ottenere la quantità necessaria di prodotto farmaceutico. Al contrario dei sistemi tradizionali che utilizzano batteri (cellule procariotiche) o cellule di mammifero, insetto e lievito (cellule eucariotiche), dalle dimensioni limitate. Anche i costi sono nettamente inferiori perché la coltivazione delle piante richiede molte meno

risorse rispetto a un fermentatore batterico o a un'altra coltura cellulare.

La prima conferma che le proteine umane potessero essere espresse in piante pur mantenendo la propria attività farmaceutica si ebbe nel 1989, con la produzione di un anticorpo umano correttamente assemblato in una pianta di tabacco transgenica. A questo successo seguirono l'espressione di particelle virus-simili (virus-like particles, Vlp) dell'epatite B, derivati anticorpali più complessi, come l'immunoglobulina A secretoria (sIgA), e proteine immunogeniche orali. Contemporaneamente alcuni vettori derivati dai virus delle piante vennero usati per esprimere antigeni derivati dalla fusione con il rivestimento proteico del virus.

La scelta della pianta da utilizzare non è casuale. Una delle specie maggiormente impiegate come bioreattore è la *Nicotiana benthamiana*, un parente della pianta del tabacco originaria dell'Australia, scelta perché ha una crescita veloce, è particolarmente favorevole alle infiltrazioni e sembra avere un sistema di silenziamento di Rna difettoso. La pianta permette di ottenere una resa che può arrivare fino a un grammo di prodotto per chilogrammo di foglie in 5-7 giorni anche se le

quantità dipendono dal tipo di proteina. Anche la scelta del vettore ha dietro studi di lunga data. Il sistema di trasferimento più comune sfrutta l'*Agrobacterium tumefaciens*, un ingegnere genetico naturale che ha radicalmente modificato il sistema di "produzione verde". L'agrobatterio vive nel terreno e infetta molte specie vegetali con la peculiarità di trasferire parte dei suoi geni nel corredo genetico della pianta una volta infettata. Benvenuto spiega che "per ottenere i prodotti farmaceutici voluti utilizzano una pianta modello, la *Nicotiana benthamiana*, che viene fatta crescere e poi immersa in un brodo di cultura che contiene un ceppo di *Agrobacterium tumefaciens*. Il batterio provoca una sindrome che si chiama "galla del colletto", dovuta a trasferimento di Dna batterico (plasmide Ti) nel genoma nucleare delle cellule vegetali. In questo modo il patogeno fa produrre alla pianta – che non muore – proteine a lui necessarie, inducendo veri e propri tumori nelle zone infette. Oggi sono stati sviluppati vettori che sfruttano solo la capacità di trasferimento ma non quella che porta a genesi tumorale". Si tratta quindi di vettori privi dei geni che provocano la malattia, in cui vengono inseriti geni esogeni (detti

anche transgeni), che codificano per biomolecole di interesse, che in questo modo penetrano all'interno della cellula vegetale. "Nel dettaglio, per far sì che l'agrobatterio – continua Benvenuto – penetri in quantità adeguata in tutti i tessuti della pianta, creiamo un vuoto spinto, che fa sì che le piante recepiscano il batterio negli spazi intercellulari. In una seconda fase lasciamo crescere i vegetali in serre speciali per qualche giorno – una settimana al massimo – e infine raccogliamo le foglie, da cui viene estratta la molecola di interesse. Il vantaggio è che sia il costo sia il tempo richiesto per la produzione delle molecole è competitivo con l'attuale processo farmaceutico utilizzato". La sequenza introdotta non è però ereditabile per cui è necessario infiltrare più piante contemporaneamente. In alternativa sono stati messi a punto anche altri approcci che prevedono l'uso di culture vegetali come quella di carote o di cellule di tabacco BY-2. Strategie che offrono il vantaggio di controllare le condizioni di crescita e hanno maggiori punti in comune con i tradizionali sistemi di produzione farmaceutici, come le culture di cellule di mammifero, insetto e lievito; ma di contro hanno costi maggiori rispetto alle tecniche agronomiche in serre controllate.

PLANTIBODY

L'anticorpo è senza dubbio la molecola maggiormente prodotta tramite piante ingegnerizzate. "Gli anticorpi monoclonali diretti contro diversi tipi di cancro sono stati espressi in modo efficiente in sistemi vegetali" spiega Marcello Donini, ricercatore del laboratorio di biotecnologie dell'Enea. "Uno dei primi esempi di produzione di anticorpo ricombinante anti-cancro è un'immunoglobulina diretta contro il marker tumorale Cea (antigene carcino-embriionario) prodotta in piante di tabacco. Altri esempi sono l'anticorpo TheraCIM specifico per il recettore del fattore di crescita (EGF-R) o un anticorpo per il trattamento del linfoma non Hodgkin da utilizzare come vaccino 'idiotipico' personalizzato. Tra le applicazioni in terapia umana, gli anticorpi possono anche essere utilizzati per combattere le malattie infettive di origine virale, batterica o fungina, rappresentando una valida alternativa ai farmaci tradizionali".

L'Enea inoltre alcuni anni fa ha partecipato al network europeo Pharmaplanta (progetto integrato del sesto Programma quadro) che ha portato alla produzione di un anticorpo prodotto in piante di tabacco, in grado di neutralizzare il virus Hiv, che ha mostrato risultati promettenti, raggiungendo la fase di sperimentazione clinica umana. "Era un anticorpo in grado di legarsi al virus dell'Hiv, usato come immunoterapia preventiva, che ha una discreta efficacia" sottolinea Benvenuto. "Abbiamo anche lavorato su un anticorpo monoclonale diretto contro il marker tumorale tenascina-C (un antigene tumore-associato) e uno ad attività anti-fungina, utilizzando un sistema di espressione di tipo 'transiente', che permette di ottenere elevati livelli di anticorpi completi in tempi brevi senza la necessità di utilizzare piante geneticamente modificate. Il ciclo di produzione risulta inoltre confinato in serre a contenimento, evitando qualsiasi contatto con l'ambiente esterno. I dati ottenuti sono stati pubblicati su importanti riviste del settore delle biotecnologie vegetali. Un filone di ricerca attuale verge su un'immunocitochina per il trattamento del linfoma non Hodgkin – continua – una molecola complessa composta da una singola catena polipeptidica che mette insieme la parte anticorpale più quella di citochina. L'immunocitochina che abbiamo ottenuto è principalmente derivata dal trastuzumab, un Mab antitumorale il cui brevetto è scaduto, per cui abbiamo potuto utilizzare la sua sequenza ormai nota, costruendo un gene sintetico che includesse anche un'interleuchina umana (IL-2). Il vantaggio della molecola ricombinante è che veicola molto meglio l'interleuchina 2 sul target tumorale, perché il binder trastuzumab individua le cellule su cui agire. L'altra nostra area di ricerca – sempre riguardo agli anticorpi – è invece rivolta all'immunoprevenzione contro la candida. La candidosi è un problema nosocomiale di grande rilevanza, così in collaborazione con l'Istituto superiore di sanità (Iss) abbiamo ingegnerizzato alcuni anticorpi fino a produrre una IgA sintetica che funziona meglio di un anticorpo monoclonale anti candida: in particolare abbiamo sviluppato un anticorpo diretto contro i beta-glucani (polisaccaridi presenti nella parete cellulare dei funghi), che è stato successivamente



ingegnerizzato fino ad arrivare anche a molecole complesse come le IgA secretorie. Le molecole anticorpali sono formate da due catene, una leggera e una pesante. Affinché la pianta le produca, devono essere introdotti due geni per la sintesi di due catene polipeptidiche che in seguito si devono autoassemblare. Premesso che i sistemi vegetali riescono a produrre anche molecole complesse come le IgA secretorie, formate da quattro polipeptidi assemblati insieme, per avere una maggiore facilità di espressione abbiamo ingegnerizzato le molecole, creando anticorpi ricombinanti. Oggi, tramite le tecniche del Dna ricombinante possiamo realizzare nuovi formati, non esistenti in natura, come gli anticorpi ricombinanti a singola catena, che sono molecole totalmente sintetiche che mantengono la capacità di legame ma sono più semplici da far produrre da qualsiasi sistema cellulare".

LA RICERCA E I SUCCESSI COMMERCIALI

Oltre agli anticorpi, le piante vengono sfruttate per produrre subunità vaccinali, virus-like particles, enzimi terapeutici e anche tossine. Oggi i farmaci in speri-



mentazione clinica sono diversi. Si passa dai vaccini sviluppati dalla Icon Genetics fino a un farmaco per il trattamento della carie, il CaroRX sviluppato dalla Planet Biotechnology, che di recente ha ottenuto l'approvazione europea come dispositivo medico nella prevenzione della carie. "C'è la possibilità di produrre antigeni per scopo vaccinale – continua Benvenuto – ma è ancora più complicato per via della lunga strada di trial clinici che sottendono all'approvazione. Mediante ingegneria proteica abbiamo montato sulla superficie di virus vegetali epitopi di virus dell'influenza, Hiv etc. e poi li abbiamo saggiati su diversi modelli animali: abbiamo ottenuto buone risposte e siamo certi che sarebbero sistemi sicuri per sviluppare nuovi vaccini. Tuttavia procedere in questo settore è difficile: già vaccini acclarati per la loro innocuità riscontrano grandi difficoltà di accettazione, immagino non andrebbe meglio con biofarmaci derivati da piante. Il nostro laboratorio però continua a lavorare sul virus del papilloma umano (Hpv 16)".

Oggi l'unico farmaco prodotto in pianta a uso umano in commercio è Elelyso, un enzima (la taliglucerasi alfa) derivato dalle

carote, che sopperisce alla carenza dell'enzima glucocerebrosidasi nella malattia di Gaucher, rara patologia genetica recessiva del metabolismo lipidico. Il medicinale sviluppato dalla Protalix biotherapeutics, un'azienda israeliana, è stato approvato nel 2012 dalla Food and drug administration (Fda) e viene prodotto dalle colture di carota. Elelyso è approvato negli Stati Uniti e in Israele dal 2012, in Brasile e Canada rispettivamente dal 2013 e 2014. Un altro esempio di successo furono le dieci milioni di dosi di vaccino contro l'influenza di tipo H1N1 prodotti in un mese da Medicago, azienda statunitense, in collaborazione con il Pentagono. L'emergenza scattata in seguito all'influenza suina del 2009 sottolineò come il tradizionale sistema di produzione dei vaccini fosse inadeguato ad affrontare situazioni simili. La Medicago decise allora di sfruttare le piante e in particolare la velocità del sistema di espressione detto transiente, per produrre un vaccino contro l'H1N1 basato sulle particelle virus-simili dell'influenza. I vaccini furono ben tollerati a tutte le dosi e studi di immunogenicità rivelarono una dose risposta definita. In seguito anche altri studi hanno confermato l'efficacia dei vaccini mono e quadrivalenti che hanno mostrato una forte risposta anticorpale nei confronti dell'influenza. Non da ultimo nel 2014, in seguito all'epidemia di ebola verificatasi in Africa, due medici infettatisi in Liberia e altre quindici persone, furono trattati negli Stati Uniti, per via compassionevole, con un cocktail di anticorpi monoclonali prodotti in piante di tabacco. Il farmaco Zmapp sviluppato dalla Mapp Biopharmaceuticals e LeafBio (Usa) in collaborazione con Defyrus (Canada), il governo statunitense e la Public health agency canadese, è ancora in fase sperimentale e non è stato ancora approvato dall'ente americano: i risultati del primo studio clinico condotto sugli esseri umani nel 2016 hanno mostrato una buona tollerabilità di Zmapp e una riduzione del rischio di mortalità del 40% nel gruppo trattato rispetto al controllo, sebbene la differenza non sia stata statisticamente significativa. Anche in questo caso parte delle ricerche dell'azienda californiana furono finanziate dal Dipartimento di ricerca del ministero della difesa americano (Defense advanced research projects agency, Darpa),

il che lascia intuire, a conferma di quanto sostengono i ricercatori, che la produzione in pianta può essere utile anche in caso di bioterrorismo o per rispondere in tempi brevi a una pandemia.

LO SCARSO INTERESSE DELLE AZIENDE

Nonostante i dati incoraggianti, le aziende però sembrano ancora poco interessate. Probabilmente perché la "rivoluzione verde" imporrebbe un rimodernamento dei sistemi produttivi cellulari con un investimento che non tutti si sentono di affrontare senza un ritorno certo. Ma non solo. Un altro limite arriva dal sistema regolatorio. Standardizzazione e Good manufacturing practices (Gmp) sono requisiti essenziali per la messa in commercio di un prodotto, che al momento il "molecular farming" non riesce a garantire. La varietà di piante e di sistemi produttivi che possono essere utilizzati per lo sviluppo di biofarmaceutici vegetali rappresentano un problema dal punto di vista normativo, per cui sarà fondamentale mettere punti saldi e creare regole nel settore. "È una sorta di rivoluzione copernicana – conclude Benvenuto – che come tutte poi andrà verso il basso, ma per ora, da parte di Big pharma, non c'è il minimo interesse a investire nella nuova tecnologia. Anzi, molte piccole company che facevano lavori egregi, sono state comprate (come Icon Genetics da Bayer) senza poi dar seguito al lavoro di ricerca. Ci sono tantissimi prodotti in fase di ricerca che arrivano ai brevetti ma poi si fermano perché mancano gli sponsor. La strada sembra molto più facile per i dispositivi medici o gli anticorpi diagnostici, invece, perché i requisiti per arrivare alla commercializzazione sono meno impegnativi rispetto all'approvazione di un biofarmaco". ▽

Parole chiave

Piante, plantibody, anticorpi, biosimilari, biologici, molecular farming

Aziende/Istituzioni

Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo sostenibile (Enea), Icon Genetics, Bayer, Planet Biotechnology, Protalix biotherapeutics, Food and drug administration (Fda), Medicago, Mapp Biopharmaceuticals, LeafBio, Defyrus, Public health agency, Defense advanced research projects agency (Darpa), Sosepharm