

## Biofarmaci verdi

Nella domanda crescente di farmaci di nuova generazione che deve contemplare lo sforzo della riduzione dei costi, i farmaci biotecnologici derivati da piante rappresentano una delle sfide delle biotecnologie avanzate in favore dell'accessibilità alle cure della maggior parte della popolazione mondiale. Le piante trasformate in biofabbriche di molecole di rilevanza farmacologica stanno rispondendo alle osservazioni cliniche con diversi prodotti innovativi che aprono ampi orizzonti per un nuovo uso delle piante, diverso dai metodi convenzionali. Il valore sociale di questo approccio, unito a metodi di biologia molecolare sempre più efficienti ed efficaci, diventa un strumento fondamentale per la diffusione di questa tecnologia

■ Eugenio Benvenuto

È noto da secoli che le piante rappresentano la più importante fabbrica naturale di composti ad azione farmacologica su cui sono ancora fondate le medicine tradizionali di antiche culture come la cinese o l'indiana (ayurvedica).

Con l'avvento delle tecnologie del DNA ricombinante le biotecnologie vegetali mettono in risalto la grande opportunità di utilizzare le piante non solo come sorgente di principi attivi endogeni, ma come un vero e proprio bioreattore per la sintesi di biofarmaci ricombinanti. Diversamente dalle molecole ottenute anche per sintesi chimica, i biofarmaci, che per definizione sono molecole complesse dal peso molecolare compreso tra 5.000 e 150.000 dalton (in alcuni casi anche fino a 500.000), possono essere ottenuti esclusivamente mediante sintesi indotta in sistemi biologici eterologhi mediante intervento genetico. Per una migliore comprensione del tipo di complessità di queste molecole, basti pensare che i farmaci basati sui classici principi attivi non superano mai i 1.000 dalton e, pur riuscendo a coprire una

ampia gamma di patologie, non riescono ad essere attivi in quelle malattie dove non ci sono alternative terapeutiche se non nelle molecole ricombinanti (ad esempio l'insulina nel diabete). In numerose pratiche cliniche non è più possibile fare a meno dei biofarmaci che rappresentano la nuova frontiera della farmacologia, in quanto naturale conseguenza del progresso delle conoscenze in molti ambiti della ricerca biomedica, da quello del cancro a quello delle malattie autoimmuni.

I prodotti biofarmaceutici (o biofarmaci) realizzati con l'ausilio delle biotecnologie hanno un *cost of good* (costo base) piuttosto alto, determinato, di solito, dalle condizioni di sintesi indotta nei vari organismi e dalle condizioni di allevamento e di estrazione della molecola prodotta. Le piante rappresentano perciò un'alternativa economicamente rilevante per la produzione a basso costo di queste molecole perché si parte da luce e semplici nutrienti per l'attivazione della sintesi complessa delle molecole ricombinanti che risultano, in molti casi, in una produzione estremamente competitiva rispetto a sistemi tradizionali basati su colture cellulari.

I primi esempi di sintesi nelle piante come bioreattori per la produzione di biofarmaceutici risalgono alla fine degli anni '80, quando fu dimostrata la possibilità

■ Eugenio Benvenuto

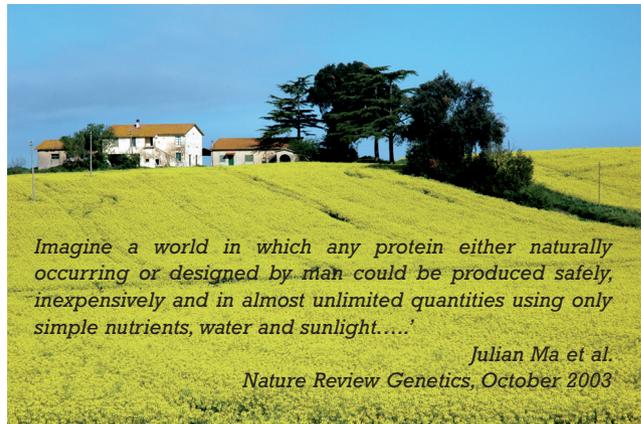
ENEA, Unità Tecnica Biologia delle Radiazioni e Salute dell'Uomo

di esprimere anticorpi completi in foglie di tabacco e l'albumina sierica umana prodotta in tabacco e patata. Queste ricerche rappresentano pietre miliari per lo sviluppo dell'area delle biotecnologie verdi, conosciuta come "agricoltura molecolare" o "*molecular farming*". Con questo termine viene genericamente indicata la produzione su larga scala di molecole ricombinanti ad alto valore aggiunto in pianta. Contrariamente a quanto si possa immaginare, la capacità delle cellule vegetali di sintetizzare, elaborare e indirizzare proteine complesse normalmente prodotte in cellule animali, le rende un sistema alternativo efficiente per l'espressione di molecole di rilevanza farmacologica. Diverse specie di piante sono utilizzate per la produzione di proteine biofarmaceutiche che possono essere accumulate nelle foglie e nei frutti (tabacco, pomodoro, erba medica e lattuga ecc.) nei tuberi (patata) o nei semi (riso, frumento, mais, piselli e soia), coprendo un ampio spettro di produzione di biomolecole (da singoli peptidi a strutture complesse come le VLP -*Virus Like Particles*-) per la terapia o la prevenzione di molte patologie.

Gli esempi di piante che mostrano di essere sistemi affidabili e convenienti per la produzione di biomolecole sono molti, pertanto si limiterà la descrizione solo ad alcuni esempi più significativi delle applicazioni di questa area delle biotecnologie.

## Vaccini per le pandemie

Esistono diverse malattie che possono dare origine a pandemie con devastanti conseguenze, se solo si pensa alle varie epidemie di peste descritte nella storia, di colera e le pandemie di influenza come "la spagnola", "l'asiatica", quella di "Hong Kong". Nel caso di pandemie influenzali, queste si presentano con una certa regolarità con intervalli di 20-40 anni. A complicare il quadro, c'è sempre la possibilità che ceppi di virus dell'influenza aviaria possano combinarsi con quella umana generando virus patogeni con potenziale di virulenza molto pericoloso per l'uomo. La soluzione immediata è sempre la formulazione di dosi di vaccino in tempi rapidi e con il maggior numero di dosi che vadano a coprire la maggior parte della popolazione a rischio. Una delle possibili alternative a quella classica della



preparazione di vaccini anti influenzali mediante uova embrionate di pollo è proprio quella della produzione a partire da tonnellate di foglie per la preparazione di milioni di dosi in tempi rapidi. È questo l'obiettivo che è stato realizzato grazie allo sforzo congiunto tra il Pentagono (nel caso specifico dall'Agenzia per Progetti Avanzati di Ricerca di Difesa -DARPA-) e una giovane impresa del settore Biotec, la Medicago Inc., che hanno annunciato quest'anno di aver realizzato la produzione di 10 milioni di dosi di vaccino contro l'influenza di tipo H1N1 in un solo mese. Questo vaccino è sotto forma di "*virus-like particles*", che rappresenta la forma più sicura di induzione di protezione vaccinale in quanto costituita solo da proteine assemblate a formare l'involucro virale in assenza di acido nucleico. Quindi un formulato vaccinale sicuro, in nessun modo in grado di replicarsi autonomamente all'interno dell'organismo trattato. Questa produzione è stata ottenuta mediante una semplice infiltrazione delle foglie con un batterio che funge da vettore per i geni virali necessari all'espressione e quindi all'assemblaggio delle proteine dell'involucro virale che vengono poi prodotte e purificate dai tessuti vegetali. È intuitivo quanto una simile tecnologia possa essere di estesa applicazione, se si considera che i vaccini di origine vegetale potrebbero essere ragionevolmente prodotti su larga scala con numeri che si aggirano intorno a 100 milioni di dosi in un mese, mentre, in questo caso, il processo della produzione attraverso le uova ha dei tempi nemmeno comparabili per arrivare a queste quantità.

## Collagene umano per applicazioni in Medicina Rigenerativa

Tra i prodotti biofarmaceutici derivati da pianta, vale la pena di menzionare quello del collagene umano di tipo 1, molecola presente nei tessuti connettivi comprese le cartilagini, che ha un'ampia gamma di applicazioni, dalla medicina rigenerativa alla chirurgia estetica, all'industria alimentare. Finora, la maggior parte delle esigenze di collagene in medicina sono soddisfatte con collagene di origine animale (bovina, suina o equina) con rischi di rigetto e possibilità di contaminazione da patogeni. Il collagene umano ricombinante ottenuto dai vegetali è invece anallergico e non-immunogenico perché prodotto in organismi privi di prioni e/o altri agenti patogeni per l'uomo. In questo specifico caso, il gene di origine umana è stato stabilmente inserito nel genoma delle piante di tabacco che sono riuscite a sintetizzare procollagene stabile, che è il precursore del collagene naturale presente nei tessuti animali. Il processo è brevettato ed industrializzato con la produzione e distribuzione di dispositivi medici a base di collagene ricombinante per applicazioni di medicina rigenerativa, soprattutto in forma di gel ed in forma di tessuto per accelerare il processo di guarigione delle ferite cutanee. Sono anche in preparazione nuovi diversi dispositivi medici conformati a spugna, membrana, fibre, per diverse molteplici applicazioni in questo campo.

## Bioterapeutici per malattie rare

Altro esempio di prodotto sul mercato prodotto da piante è la glucocerebrosidasi enzima assente o parzialmente funzionante nella malattia di Gaucher, malattia rara di tipo autosomico recessivo (occorre cioè che entrambi i genitori siano portatori del gene alterato e lo trasmettano al figlio). La funzione della glucocerebrosidasi è quella di trasformare il glucocerebroside, sostanza di degradazione cellulare, in zuccheri (glucosio) e grassi (ceramide) riutilizzabili. Quando questa funzione è carente, il glucocerebroside si accumula nei lisosomi dei macrofagi, che quindi crescono di dimensioni. Queste cellule prendono il nome di cellule di Gaucher e si concentrano soprattutto

nella milza, nel fegato e nel midollo osseo, alterando le normali funzioni di questi organi. Come in molti casi di malattie rare, la spinta per la realizzazione di prodotti terapeutici non è certamente operata dalle grandi case farmaceutiche ed è proprio questo uno dei casi in cui la piccola e media impresa del settore Biotec può ricavare una nicchia di produzione di biofarmaceutici "salva-vita". È il caso della Protalix Biotherapeutics, che ha realizzato la produzione di taliglucerasse alfa, farmaco di origine ricombinante, appena approvato dalla Food and Drug Administration per una somministrazione intravenosa in sostituzione dell'enzima mancante in pazienti con la malattia di Gaucher di tipo 1, la più diffusa, che non presenta disturbi neurologici. Il farmaco è realizzato grazie a una nuova tecnologia produttiva di "molecular farming" basata su cellule di carota, estremamente efficace ed economica.

Ovviamente, come in tutti i sistemi di espressione eterologa, le piante hanno alcuni limiti, per esempio quando i livelli di produzione non sono così soddisfacenti per rappresentare una convenienza economica. Quest'ultima, però, può dipendere anche dalle difficoltà tecniche e dai costi relativi alla purificazione del prodotto. Purificazione che comunque può variare a seconda del farmaco e delle sue modalità di somministrazione. Un aspetto di particolare importanza è quello relativo a modificazioni del prodotto proteico, come la glicosilazione. Infatti, nel caso delle piante, gli zuccheri che vengono addizionati alle proteine espresse potrebbero essere diversi, con effetti sulla perfetta equivalenza delle molecole prodotte e con conseguenze da valutare, caso per caso, sulla effettiva funzionalità ed eventuale immunogenicità del derivato. Negli ultimi anni, enormi sforzi si stanno compiendo per risolvere le maggiori problematiche relative alla sostanziale equivalenza del prodotto derivato da pianta, con risultati davvero molto incoraggianti.

In questo quadro è importante anche considerare che la condizione necessaria per cui un biofarmaceutico derivato da pianta possa rimanere competitivo è che i tempi di sviluppo, di valutazione e iter autorizzativo del un nuovo prodotto, prima della commercializzazione rimangano, nella media, simili a quelli previsti da

altri sistemi di produzione già affermati per la sintesi di alcuni biofarmaci. Circostanza questa non sempre verificata con i prodotti innovativi, specialmente se da sistemi come le piante, considerati non convenzionali, che quindi incontrano non poche difficoltà ad entrare nella filiera delle attività regolatorie in campo tecnologico-farmaceutico.

Questi ed altri esempi qui brevemente illustrati sottolineano la grande risorsa delle piante per usi innovativi come quello della produzione di biofarmaci. Il cammino è solo all'inizio, ma la strada è tracciata verso la 'coltivazione' dell'innata capacità della biofabbrica vegetale per la realizzazione di biofarmaci a costi ridotti, quindi accessibili alla maggior parte della popolazione umana. In gioco ci sono milioni di vite e un mercato ricco e vastissimo.

#### Bibliografia

- [1] <http://biotecnologie.casaccia.enea.it/home.html>
- [2] Expert Review of Vaccines, vol. 9 no. 8, August 2010 (Special focus issue on Plant- derived vaccines).
- [3] Lico C., Buriani G., Capuano F., Benvenuto E., Baschieri S. "Influenza vaccines: new perspectives from plants". In: Plant-derived Vaccines: Technologies & Applications, Buonaguro L. Ed., Future Medicine, 2011. pp. 104-115.
- [4] *Innovation in Vaccinology from design, through to delivery and testing* (Baschieri Editor) 2012 Springer ISBN 978-94-007-4542-1.
- [5] Capodicasa C., Donini M., Villani M.E., Benvenuto E. (2011). *Rapid and high yield production of immunotherapeutic plant-made antibodies*. Future Medicine, E-Pub DOI10.2217/EBO.11.76.
- [6] De Muyck B., Navarre C., Boutry M. "Production of antibodies in plants: status after twenty years". Plant Biotechnol J. 2010; 8(5):529-63.
- [7] Horn ME. "Plant molecular pharming 2012 and beyond". Plant Cell Rep. 2012 31(3):437-8.
- [8] Xu J., Dolan M.C., Medrano G., Cramer C.L., Weathers P.J. *Green factory: plants as bioproduction platforms for recombinant proteins*. Biotechnol Adv. 2012 30(5): 1171-84.
- [9] Paul M., Ma J.K. "Plant-made pharmaceuticals: leading products and production platforms". Biotechnol Appl Biochem. 2011;58 (1):58-67.