

Biotechnologie per la produzione di biofarmaci

IN BREVE

- **PROCESSI E STATO DELLE RICERCHE** - La pianta costituisce un adeguato sistema biologico per la produzione su larga scala di biofarmaci e in particolare di anticorpi per uso farmacologico che, nei prossimi anni, potrebbero rappresentare circa il 40% della produzione globale di biofarmaci. Il processo di produzione consiste nel far produrre alla pianta la proteina d'interesse mediante l'inserimento del DNA corrispondente sia in una forma stabile (pianta transgenica) sia mediante un procedimento transiente. La pianta è in grado di portare avanti l'espressione di questo DNA parallelamente al proprio, producendo così la molecola di interesse che si accumula nel tessuto o in determinati compartimenti cellulari. In particolare la produzione di anticorpi in pianta contiene un valore aggiunto legato alla facilitazione delle operazioni di recupero/purificazione dal momento che gli anticorpi costituiscono una classe di molecole non presenti naturalmente nelle piante. Sono stati raggiunti notevoli risultati nel mondo e la tecnologia si trova ad un avanzato stato di R&S, con punte di sviluppo pre-commerciale nel Regno Unito (produzione in pianta di un anticorpo contro la carie) e commerciali negli Stati Uniti in un settore limitrofo (produzione di enzimi in pianta). In Europa, l'ENEA realizzò il primo anticorpo ingegnerizzato funzionalmente prodotto in pianta (1991-1993) e continua a mantenere una posizione di rilievo nel settore.
- **APPLICAZIONI E COSTI** - Attualmente le aree principali di mercato dei biofarmaci comprendono l'oncologia, i vaccini, i farmaci per disturbi circolatori e gli anti-infettivi. La capacità di produzione industriale è fortemente sottodimensionata rispetto alle previsioni e i costi sono ancora elevati. E' molto sentita l'esigenza di trovare nuovi sistemi di produzione a costi più contenuti. La produzione in pianta rappresenta un'alternativa di grande interesse per il basso investimento iniziale (limitato al campo agricolo in cui avviene la produzione), l'elevata flessibilità e soprattutto per la riduzione dei rischi per la salute umana. Una quantificazione attendibile dei benefici economici di tale sistema di produzione non è disponibile in quanto i costi attuali di molti farmaci biotech, in particolare degli anticorpi, non sono facilmente resi noti dalle aziende e la distribuzione avviene esclusivamente attraverso strutture ospedaliere. Si stima tuttavia che la produzione in pianta sia in grado di abbattere i costi di produzione di alcuni ordini di grandezza.
- **POTENZIALE DI SVILUPPO E BARRIERE** - La produzione di farmaci con tecniche biotecnologiche rappresenta un settore in espansione nell'ambito della produzione farmaceutica globale. Nel *Global Biotech Report 2005*, il fatturato mondiale del settore era valutato in circa 71 miliardi di dollari con una crescita del 16.5 % rispetto al 2004, e con la prospettiva di rappresentare nel 2010 il 17% delle prescrizioni totali (12% del 2004). Nel luglio del 2006, la definizione di linee guida per la produzione di biofarmaci in piante transgeniche da parte di EMEA (European Medicines Agency) ha parzialmente colmato un vuoto legislativo che penalizzava l'intero settore in Europa. La normativa prevede la possibilità di coltivare piante transgeniche per produrre biofarmaci, ma persiste in Europa una percezione pubblica negativa nei confronti delle piante transgeniche. Ciò potrebbe limitare l'interesse degli investitori, penalizzare la ricerca e danneggiare l'Europa nella competizione globale.

PROCESSI E STATO DELLE RICERCHE - Nell'ambito della produzione globale di farmaci, la produzione con tecniche biotecnologiche rappresenta un settore di rilievo e in forte espansione. I grandissimi profitti realizzati a partire dagli anni '80 con la produzione biotecnologica di molecole già note, testate e di largo impiego (e.g., insulina) hanno consentito di sostenere i costi della ricerca per la realizzazione di nuove molecole. Attualmente sono circa 80 i biofarmaci commercializzati e almeno 500 sono in fase di sperimentazione clinica, con continui avanzamenti delle conoscenze sull'eziologia delle varie patologie. Tra tutti i biofarmaci, gli anticorpi ricombinanti (rAbs) e i loro derivati trovano sempre più applicazione clinica. Dal 1975, anno in cui con successo venne sviluppato *in vitro* il primo anticorpo monoclonale da ibridoma, gli anticorpi sono stati estesivamente studiati e testati come agenti diagnostici e terapeutici *in vivo*, ma anche *ex-vivo*. Gli avanzamenti scientifici e tecnologici hanno presto posto rimedio (anticorpi umanizzati e umani) ad una introduzione inizialmente lenta, ostacolata dall'insorgere di effetti collaterali avversi (Hama). Il potenziale terapeutico degli anticorpi monoclonali è immenso e si stima che il loro impiego possa raggiungere il 40% dell'intero mercato dei biofarmaci. Attualmente esistono chiare indicazioni cliniche nei settori delle terapie oncologiche, dei trapianti, dei trattamenti ormonali, delle malattie autoimmuni e dei disturbi cardiovascolari. Gli alti

costi di sviluppo e di produzione dei biofarmaci rappresentano tuttavia ancora un limite. Attualmente la produzione di proteine ricombinanti viene effettuata in fermentatori industriali utilizzando come bioreattori opportune cellule di mammifero. Tale sistema richiede tecnologie sofisticate, personale specializzato e alti costi di sicurezza rispetto ai rischi di contaminazione dei fermentatori con patogeni e/o tossine dannosi per la salute

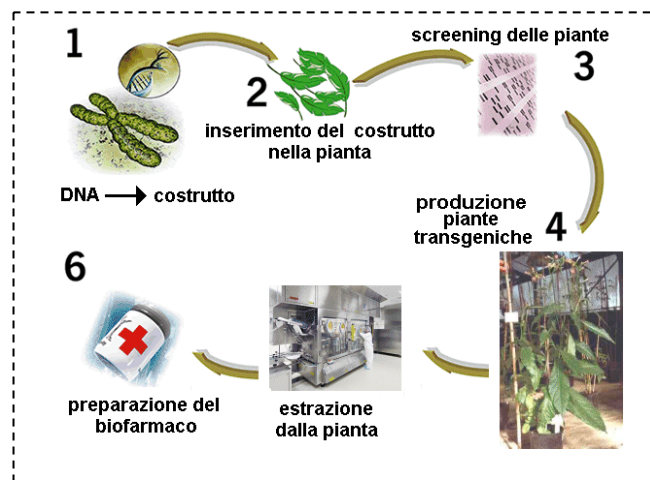


Fig.1 - Produzione di biofarmaci in piante transgeniche

umana. Le biotecnologie vegetali (Fig. 1) consentono di utilizzare le piante come valida alternativa ai sistemi di coltura in cellule animali. Le piante sono infatti in grado di eseguire tutti gli stadi molecolari richiesti e i prodotti ottenuti sono indistinguibili da quelli ottenibili con i metodi convenzionali. Le consolidate conoscenze della pratica agricola consentono di operare con ridotti investimenti di capitale iniziale, manodopera convenzionale, e grande flessibilità di produzione rispetto alle richieste di mercato, fattori che conducono a costi di produzione relativamente bassi. Le piante inoltre non possono essere ospiti di pericolosi patogeni umani, come i prioni, e il loro utilizzo per la produzione di vaccini prefigura la possibilità di somministrazione diretta dei vaccini edibili, risolvendo anche gli ingenti problemi di conservazione che spesso ostacolano l'attuazione di campagne di vaccinazione in aree depresse del pianeta. Ciò costituisce un ulteriore rilevante vantaggio offerto dalle biotecnologie vegetali.

■ **Fasi tecnologiche e fasi sperimentali** - Il processo che conduce alla produzione della molecola in pianta prevede una serie di fasi di ricerca. Ogni molecola rappresenta un caso a sé e pertanto l'intero processo va studiato ed ottimizzato caso per caso. Nelle considerazioni che seguono, la molecola biofarmaco per una determinata patologia viene considerata come obiettivo e la tecnologia di produzione si riferisce non a tecniche biologiche per l'ottimizzazione terapeutica della molecola stessa ma soltanto ai processi che ne conducono alla produzione in un sistema vegetale. Possiamo individuare le seguenti fasi tecnologiche, che possono comprendere diverse possibili strategie. Inizialmente (**prima fase**) è necessario ottenere un sistema che contenga il DNA di interesse in una forma adeguata per la produzione della proteina corrispondente. Pertanto il DNA codificante viene clonato in un opportuno sistema di espressione la cui scelta dipende dalle fasi successive. Sono possibili le seguenti opzioni: ● **Inserimento del DNA in forma stabile e produzione di una pianta transgenica** - La scelta della pianta (alimentare, non alimentare, ad alto contenuto proteico, etc.) può dipendere da fattori esogeni. In alcuni casi (es: tabacco) la scelta può essere volta anche al recupero di un settore in crisi. La scelta del compartimento di accumulo della molecola prodotta è funzione della resa finale e del sistema di recupero (intero tessuto vegetale, radice, seme, cloroplasto, corpi oleosi, etc.). In questa fase si individuano anche soluzioni adeguate per i problemi legati al silenziamento del transgene e all'ottimizzazione del processo attraverso cui si ottiene la pianta transgenica; ● **Inserimento in cellule vegetali transgeniche** - Tale tecnologia pur usando i fermentatori si avvale dell'uso di cellule vegetali invece delle cellule animali, privilegiando gli aspetti di sicurezza e il biocontenimento; ● **Inserimento in un opportuno virus vegetale disarmato** con cui vengono infettate le piante che produrranno poi la proteina di interesse in modo transiente (non diventando in tal modo piante transgeniche - ossia il transgene non è ereditabile dalla progenie). Indipendentemente da quale delle precedenti opzioni viene messa in opera, è poi necessaria una **seconda fase** per l'estrazione e la purificazione della molecola (spesso legata alle scelte effettuate precedentemente) ed una **terza fase** per la caratterizzazione della molecola finale che deve

ottemperare ad una serie di stringenti requisiti tra cui la completa identità con la molecola prodotta in un sistema animale e l'assenza di qualsiasi contaminante potenzialmente pericoloso. Tecniche e procedure sono state messe a punto in circa 20 anni di sperimentazione in cui sono state sviluppate una serie di molecole per importanti patologie umane ed animali che hanno dimostrato la fattibilità dei processi. Tra le varie applicazioni, ad esempio, l'anticorpo 38C13scFvNHL, promettente vaccino contro il linfoma non-Hodgkin¹, e i vaccini edibili preparati in piante transgeniche commestibili (mais, patata, spinaci). Nel 2006, l'USDA (United States Department of Agriculture) ha approvato il primo vaccino per uso animale prodotto in pianta attraverso cellule vegetali in un sistema a totale contenimento sviluppato dalla Dow AgroSciences. Le scelte tecniche sono spesso influenzate dalle indicazioni normative. Ad esempio, in Europa, soltanto di recente (2006) sono stati definiti i sistemi ammissibili con esclusione sia dei sistemi transienti che della produzione in cellule vegetali. Le scelte normative a loro volta sono spesso influenzate dal livello di informazione, dalla percezione pubblica e dal clima sociale. In Europa, l'ostilità verso le piante transgeniche potrebbe indirizzare obbligatoriamente le attività di R&S verso strategie di produzione che utilizzano sistemi a contenimento totale, come le colture idro/aeraponiche, le colture cellulari, o l'uso di piante non alimentari, solo per fare alcuni esempi.

APPLICAZIONI E COSTI - La produzione in pianta della prima molecola con potenziale applicazione farmacologica risale al 1986, con la produzione in tabacco dell'ormone della crescita. La produzione del primo anticorpo monoclonale in pianta risale al 1989, e già nel 1993 l'ENEA, prima in Europa, produceva in pianta un frammento anticorpale in grado di conferire al tabacco la resistenza ad uno specifico virus vegetale. Da allora, nuove conoscenze, metodiche, applicazioni e brevetti hanno portato alla produzione di anticorpi, ormoni, enzimi, vaccini e nutraceutici. Un elenco esaustivo dei brevetti e dei risultati conseguiti è disponibile presso il sito web <http://www.molecularfarming.com/molecular-farming-patents.html> che fornisce anche una precisa indicazione dello sforzo prodotto e dell'interesse che la tematica ha suscitato in circa 20 anni nel mondo, con una fortissima predominanza della ricerca statunitense. Anche se molti problemi hanno ritardato la commercializzazione, nondimeno alcuni enzimi come l'avidina, la b-glucuronidasi (GUS), la tripsina e l'aprotinina prodotti in piante geneticamente ingegnerizzate sono stati introdotti sul mercato della ricerca e in quello farmaceutico come un'alternativa alle produzioni tradizionali da fonti batteriche o animali (Sigma-Aldrich Inc., San Diego). Vaccini edibili contro l'epatite B e l'enterocolite acuta (TD) umani sono stati prodotti in patate e testati efficacemente su volontari e sono allo studio piante più commestibili, come la banana e il pomodoro. Opportuni antigeni per combattere le tre

¹ prodotto in modo transiente in piante di tabacco, in quanto l'approccio terapeutico utilizzato richiedeva un sistema di produzione flessibile in cui la molecola di base potesse essere "facilmente" modificata e adattata al singolo paziente e potesse poi essere prodotta con alta resa, solo per il tempo necessario

principali cause di enterite infettiva acuta nei paesi poveri (colera, rotavirus e batterio fecale enterotossigenico, ETEC) sono stati prodotti in piante edibili e assemblati in modo da formare vaccini multicomponenti, che si sono dimostrati efficaci in modelli animali. Sono stati ottenuti in pianta anticorpi efficaci per malattie infettive quali il virus dell'herpes (HSV), l'anti-Respiratory Syncytial Virus (RSV), il *Clostridium difficile*-associated diarrhea, la rabbia, l'epatite B, l'epatite C e il citomegalovirus, e contro antigeni associati a vari tumori, (colonretto, seno, ovaie, linfoma non-Hodgkin) e l'antigene carcinoembrionario. Nel Regno Unito sta per essere lanciato sul mercato il CaroRxTM, un anticorpo secretorio che combatte la carie, che rappresenta il biofarmaco prodotto in pianta allo stadio di sviluppo più avanzato. Lo sforzo maggiore riguarda la produzione di anticorpi ma altre molecole di largo uso, come il collagene, sono state anche ottenute con successo.

La produzione di una nuova molecola biofarmaco richiede un lungo processo e ingenti investimenti, con un rischio di fallimento che permane elevato fino alle tappe più avanzate dei test clinici. I tipici flussi di cassa e il valore della tecnologia di un farmaco biotecnologico sono schematizzati in Fig. 2 per l'intero processo di vita.

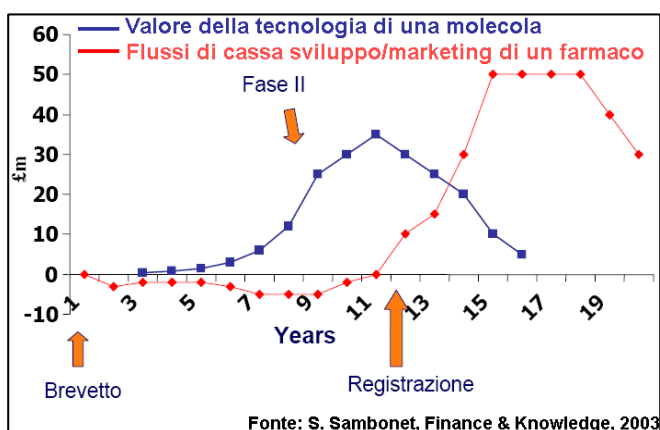


Fig. 2 – Valore e flusso di cassa nello sviluppo di una nuova molecola-farmaco

Per quanto riguarda i costi, la Tab. 1 riporta un confronto tra costi e rese produttive di vari metodi per la produzione di anticorpi. I dati sono tratti da uno studio pubblicato nel 1999 (Harris, 1999), uno dei pochi disponibili in letteratura, ma possono fornire indicazione sui vari sistemi di produzione.

Tab 1 - Costi e rese per la produzione di anticorpi in diversi sistemi biotecnologici (Harris, 1999)		
Produzione da:	Rese	Costo (£/g)
Cellule di mammifero	0,5-1 g/l	300
Latte transgenico	10 g/l	60
Batteri	3 g/l	1
Piante transgeniche	2 g/kg	0,3
Piante transienti	10 g/kg	0,006

POTENZIALE DI SVILUPPO E BARRIERE - La produzione biotecnologica di farmaci costituisce un settore con potenziale virtualmente illimitato. Le ricerche che si avvalgono dei più avanzati strumenti di genomica, proteomica, metabolomica

sono teoricamente in grado di studiare e risolvere ogni tipo di patologia e trauma attraverso specifici farmaci biotecnologici. Il processo che conduce ad una nuova molecola biofarmaco è lungo e costoso, ma si ritiene che esso costituisca la soluzione più promettente ed economica. Il sistema di produzione in pianta rappresenta una ulteriore opzione per lo sviluppo di biofarmaci con grande potenziale di riduzione dei costi e incremento della sicurezza. Un elenco aggiornato dei diversi prodotti disponibili e del loro stato di sviluppo è disponibile presso il sito web <http://www.molecularfarming.com/PMPs-and-PMIPs.html>. Il Global Biotech Report 2005 valuta il volume d'affari mondiale del settore in circa 71 miliardi di dollari e prevede che nel 2010 esso rappresenterà il 17% di tutte le prescrizioni, con un aumento di cinque punti percentuali rispetto al 2004. Attualmente il mercato è concentrato su 9 aree principali, tra cui oncologia, vaccini, farmaci legati ai disturbi circolatori (leader del mercato) e anti-infettivi. In questo panorama la posizione dell'Europa non appare molto forte e gli analisti prevedono nei prossimi anni un crollo della quota Europea nel mercato delle biotecnologie. I recenti interventi legislativi volti ad armonizzare l'intero settore farmaceutico potrebbero invertire l'attuale tendenza. In particolare, la definizione di linee guida per la produzione di biofarmaci in piante transgeniche, da parte della European Medicines Agency (EMA), nel luglio del 2006, ha parzialmente risolto un vuoto legislativo che aveva finora fortemente penalizzato l'intero settore in Europa, limitando l'interesse degli investitori e penalizzando la ricerca e i risultati. La normativa prevede la possibilità di coltivare piante transgeniche per produrre biofarmaci e regolarizza tutte le fasi, dalla genetica dello sviluppo del farmaco alla sua produzione e ai controlli. La normativa esclude l'utilizzo di piante transfettate in modo transiente e la produzione in cellule vegetali, senza specificare se saranno oggetto di un successivo intervento legislativo. Il fatto che nel precedente documento del 2002 il sistema transiente era esplicitamente considerato non eleggibile, suggerisce invece una scelta definitiva per il sistema di trasformazione stabile in piante transgeniche. Queste scelte sono significative in quanto condizionano scelte tecniche, programmi di ricerca e investimenti, chiudendo di fatto la porta a settori potenzialmente interessanti sotto il profilo tecnico-scientifico. Una scelta verso l'uso esclusivo delle piante transgeniche potrebbe impedire all'Europa realizzazioni in grado di competere efficacemente con gli Stati Uniti. Teoricamente l'uso di piante transgeniche per scopi legati alla salute umana potrebbe offrire una maggiore accettabilità presso il pubblico, ma mancano dati in proposito e va ricordato che in Europa persiste un atteggiamento di opposizione nei confronti delle piante transgeniche. La Tab. 2 fornisce un elenco parziale dei risultati ottenuti: sono elencate alcune delle molecole prodotte in pianta e le relative potenziali applicazioni, indicando le piante utilizzate per le varie produzioni. Come si vede la tecnologia si applica alle maggiori patologie umane. Per alcuni di queste molecole sono in corso trials clinici.

Tab. 2 – Alcune molecole ottenute in pianta e loro applicazioni come biofarmaci e vaccini.

Biofarmaci per uso umano espressi in pianta		
Biofarmaco	Applicazioni	Pianta ospite
Human growth hormone	Growth hormone	Tobacco, Sunflower
Enkephalin	Antihyperalgesic by opiate activity	Arabidopsis
Human serum albumin	Liver cirrhosis, burns, surgery	Tobacco, Potato
Human β -interferon	Antiviral treatment	Tobacco
Angiotensin-I-converting enzyme	Hypertension	Tobacco, Tomato
Human epidermal growth factor	Wound repair and control of cell proliferation	Tobacco
α -trichosanthin from TMV-U1subgenomic coat protein	HIV therapies	Benthamiana
Trout growth factor	Growth factor	Tobacco
Human α -interferon	Hepatitis C and B treatment	Rice
Hirudin	Thrombin inhibitor	Canola
Erythropoetin	Anaemia	Tobacco Suspension cells
Glucocerebrosidase, human protein C serum protease	Anticoagulant	Tobacco
Human α and β haemoglobin	Blood substitute	Tobacco
Human muscarinic cholinergic receptors	Cell receptors	Tobacco
Interleukin-2 and Interleukin-4	Immune regulation	Tobacco Suspension cells
Human placental alkaline phosphatase	Reporter gene	Tobacco Rhizosecretion
Human α 1-antitrypsin	Cystic fibrosis, liver disease and haemorrhage	Rice Suspension cells
Human growth hormone (somatotrophin)	Growth hormone	Tobacco Seeds
Human growth hormone (somatotrophin)	Growth hormone	Tobacco Chloroplasts
Human homotrimeric collagen	Collagen	Tobacco
Human lactoferrin	Antimicrobial	Potato
scFv	Oxazolone	Potato tuber, ER
IgG1	HSV-2	Glycine max Plant, Secretory pathway
scFv	Dihydro-flavonol 4-reductase	P.hybrida Leaf, Cytosol
IgG	Colon cancer surface antigen	Benthamiana
IgG	HSV-2	Soybean
IgG	Human IgG	Alfa Plant, Apoplast
ScFv, IgG1	CEA	Tobacco Leaf, Transient expression
scFv	Tospovisuses	Benthamiana Plant, ER, Apoplast
bi-scFv	TMV	Tobacco Suspension cells, Leaf, Apoplast, ER
scFv	CEA	Rice Suspension cells, Leaf, ER and Apoplast
scFv	38C13 mouse B cell lymphoma	Benthamiana Leaf, Apoplast
scFv	CEA	Bread wheat Plant, ER and Apoplast
scFv	TMV	Tobacco Leaf, Apoplast and Membrane
IgG1	Streptococcal surface antigen (I/II)	Tobacco Plasma membrane
scFv	Chlorophopham	Arabidopsis ER, Apoplast
Vaccini ricombinanti espressi in pianta		
Vaccino	Applicazioni	Pianta ospite
Envelope surface protein	Hepatitis B virus (humans)	Tobacco, Potato, Lupin (Lupinus spp.), Lettuce
Heat-labile toxin B-subunit	Enterotoxigenic E.coli (humans)	Tobacco, Potato, Maize
Glycoprotein	Rabies virus (humans)	Tomato (expressed on virus particles)
Malarial B-cell epitope	Malaria (humans)	Tobacco
Capsid protein	Norwalk virus	Tobacco, Potato
Hemagglutinin	Influenza	Tobacco
V.cholerae toxin CtoxA and CtoxB subunits	Vibrio cholerae (humans)	Potato
Mink enteritis virus epitope (VP2)	Resistance to mink enteritis virus (domestic animals)	Blackeyed bean
VP1	Foot-and-mouth disease virus (agric.domestic animals)	Arabidopsis, Alfalfa
Glycoprotein S	Transmissible gastroenteritis coronavirus (pigs)	Arabidopsis, Maize, Tobacco
E.coli Lt-B toxin	Enterotoxigenic E.coli (humans)	Potato
Streptococcus mutans surface protein SpaA	Dental caries (humans)	Tobacco, Potato
VP60	Rabbit emorrhagic disease virus (rabbit)	Potato
Glycoprotein B	Human cytomegalovirus (humans)	Tobacco
D2 peptide of fibronectin-binding protein of Staphylococcus aureus	Mucosal vaccine not requiring adjuvants (human)	Cow-pea
Peptides 10 and 18 OMP-FP.auruginosa	Pulmonary infections	Cow-pea
Diabetes associated autoantigen	Diabetes	Tobacco, Carrot, Potato
Human rhinovirus epitope (HR14)	Rhinovirus	Blackeyed bean(Expressed on virus particles)
HIV epitopes	HIV	Tobacco, Cow-pea, Blackeyed bean

Riferimenti e Ulteriori Informazioni - Ashton G. (2001) Nature Biotech., 19: 307-311; Harris B. (1999) TIBTECH 17: 290-296; Hood E., Woodard S.L. and Horn M.E. (2002) Curr. Opin. Biotech. 13(6): 630-635; Ma J.K., Drake P.M.W. and Christou P. (2003) Nature Genetics, 4: 794-805; McCormick A.A. et al. (2003) J. Immunol. Methods, 278: 95-104; Miller G (2003) Preclinica, 1(3): 91-93; Parmenter D.L., et al. 1995 Plant Mol. Biol., 29: 1167-1180; Perrin Y. et al. (2000) Molecular Breeding, 6: 345-352; Reichert J.M. (2001) Nature Biotech., 19: 819-822; Schillberg S., Fischer R. and Emans N. (2003) CMLS., 60: 433-445; Walsh G. (2000) Nature Biotech., 18: 831-833; Walsh G. (2002) Eur. J. Pharm. Sci., 15: 135-138; Sambonet S. (2003) Finance & Knowledge - Il finanziamento della ricerca biotech. 21.11.2003

Principali Istituzioni e Operatori - Meristem Therapeutic, Fr; Planet Biotechnology, USA; Dow Agrisciences, USA; Arizona State University-USA, University of Central Florida, USA; Loma Linda University, CA, USA; Guy's Hospital, London-UK; Fraunhofer Institute-IME, D.

Tab.3 - Informazioni sulle attività svolte da ENEA

<p>Processi/tecnologie sviluppati da ENEA e motivazione delle scelte</p> <p>Tecnologia del vettore binario per la produzione di anticorpi in pianta, sistema di avanguardia brevettato ENEA, risultato degli avanzamenti delle conoscenze internazionali e dell'inventiva dei ricercatori. Tecnologia della produzione di molecole esogene in pianta e del loro indirizzamento al sistema radicale, in colture idroponiche e aeroponiche, allo scopo di aumentare la resa, facilitare il recupero della molecola di interesse e rispondere, con un sistema che può essere costruito a completo contenimento, alle preoccupazioni sociali che potrebbero ostacolare la produzione di piante transgeniche in campo aperto.</p>
<p>Realizzazioni e impianti sperimentali e/o dimostrativi</p> <p>Non esistono laboratori o impianti dedicati: il lavoro viene svolto nei laboratori convenzionali di biologia molecolare, avvalendosi di una serie di altri strumenti/strutture, quali la serra transgenica, che servono anche per questa ricerca. Gli studi sono alla fase laboratorio, non si è ancora passati alla fase impianto scala-banco o pilota.</p>
<p>Obiettivi di R&S, risultati conseguiti e attesi da ENEA</p> <p>Nel corso degli anni la tecnologia è stata applicata alla produzione di diversi anticorpi per la diagnosi/terapia di varie patologie:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Costruzione, espressione e valutazione dell'anticorpo scfv-800E6 contro l'antigene HER2 correlato al tumore del seno e dell'ovaio umano e produzione in pianta di una molecola chimera per la coniugazione con un fluoroforo da usare per la diagnosi: il progetto è stato variamente finanziato e attualmente è alla fase di ottimizzazione dell'espressione in radice. ● Costruzione, espressione e valutazione dell'anticorpo scfv-antiHMW contro un antigene di melanoma umano, progetto interrotto per il silenziamento del gene esogeno nella progenie delle piante. ● Espressione e valutazione dell'anticorpo scfv-antiAD da impiegarsi nella terapia dell'Alzheimer che viene studiato per la produzione in un sistema aeroponico di patata e tabacco ed è attualmente nella fase di sperimentazione. ● Sviluppo della modellistica quale strumento predittivo per la valutazione delle caratteristiche chimico-fisiche, biologiche e tossicologiche di anticorpi ingegnerizzati.
<p>Risorse impegnate in attività di R&S e dimostrazione</p> <p>Risorse umane impegnate: Senior Scientists: Patrizia Galeffi, Cristina Cantale, Maria Sperandei, Vittorio Rosato; Scientist: Caterina Arcangeli; Technician: Eleonora Palmieri; PhD student Margherita Pugnali. Strutture utilizzate preesistenti e/o accessoriate con strumentazione acquisita tramite i progetti o risultato di investimenti ENEA (serra transgenica): Laboratori di biochimica e biologia molecolare, Serra a contenimento per piante transgeniche, camere di crescita e congelatore -80, laboratorio monoclonali, Quantitative Real-Time PCR, Workstation SGI per la modellistica molecolare con software dedicato (InsightII) e altri computer dedicati. (Nessun finanziamento ENEA tranne spese di personale)</p>
<p>Collaborazioni, Finanziamenti esterni,</p> <p>Collaborazioni: Laboratorio di Immunologia dell'Istituto Regina Elena, Roma; Prof. M. Bucher, Institute of Botany, Koln University, DE. Finanziamenti tramite progetti di Ricerca presentati a bandi nazionali: AIRC (Associazione Italiana Ricerca Cancro): €15,000; CNR Biotechnologie: €15,000; CNR Progetto Finalizzato Biotechnologie: €50,000; borsa di studio di FIDAF per fellowship presso strutture estere: €3600; MIUR: FIRB RBNE03FH5Y AD-ART: €368,000</p>
<p>Brevetti, pubblicazioni, articoli, citazioni su primarie riviste/publicazioni scientifiche, congressi e siti web qualificati</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Benvenuto E., Cattaneo A., Ordàs R.J., Biocca S., Tavazza R., Ancora G. and Galeffi P. 'Phytoantibodies : a general vector for the expression of immunoglobulin domains in transgenic plants' Plant Mol Biol 13: 685-692 (1991). ● Tavladoraki P., Benvenuto E., Trinca S., De Martinis D., Cattaneo A. e Galeffi P. 'Transgenic plants expressing a functional "single chain Fv" antibody are specifically protected from virus attack' Nature 366:469-472 (1993). ● European patent n. BE-92830330.4 del 25/06/1992 e Italian patent n. RM-91A000474 del 28/06/1991: Vettori plasmidici per l'espressione di geni in piante. ● Italian Patent n° RM 92A000493 del 30/06/1992: Metodo di riconoscimento e separazione di cellule vegetali che esprimono sequenze di acido nucleico esogeno. ● European Patent n. 94830567.7 on 7/12/94 e Italian Patent n. RM93A000818 del 10/12/93: Piante transgeniche come biofabbrica per la produzione di anticorpi ingegnerizzati ad uso farmacologico. ● Galeffi P., Lombardi A., Di Donato M., Latini A., Sperandei M., Cantale C. and Giacomini P. 'Expression of single chain antibodies in transgenic plants' Vaccines 23 : 1823-1827 (2005). ● Cantale C., Sperandei M. and Galeffi P. 'Antibody production in transgenic plants: assembly, applications, advantages & bottlenecks' In Plant Genetic Engineering, volume 8, "Metabolic Engineering & Molecular Farming-II" Pawan K. Jaiwal and Rana P. Singh editors. STADIUM PRESS LLC, USA pp.185-240. ● Lombardi A., Sperandei M., Cantale C., Giacomini P. and Galeffi P. 'Functional expression of a single-chain antibody (scFv) specific for the HER2 human oncogene in a bacterial reducing environment' Protein Expression And Purification, 44 (2005) 10-15. ● Galeffi P., Lombardi A., Pietraforte I., Novelli F., Di Donato M., Sperandei M., Tornambé A., Fraioli R., Martayan A., Natali P.G., Benevolo M., Mottolese M., Ylera F., Cantale C. and Giacomini P. 'Functional expression of a single-chain antibody to ErbB-2 in plants and cell-free systems' Journal of Translational Medicine 4:39 (2006).

PATRIZIA GALEFFI ha conseguito la laurea in Scienze Biologiche nel 1982 e il Dottorato di Ricerca nel 1988, entrambi presso l'Univ. degli Studi di Roma La Sapienza. Dal 1989 è primo ricercatore presso il Centro Ricerche ENEA Casaccia dove si occupa di biologia molecolare degli anticorpi e del loro utilizzo sia per la protezione delle piante da patogeni sia in progetti di plant factory per la produzione in sistemi vegetali di molecole per uso farmacologico. I risultati conseguiti sono riportati in numerose pubblicazioni scientifiche su riviste internazionali e in 5 brevetti nazionali ed europei in ambito biotecnologico. Dal 2003 è responsabile di una attività di ricerca nel campo del miglioramento genetico del grano duro per la tolleranza agli stress abiotici in collaborazione con il CIMMYT (International Maize and Wheat Improvement Center). Patrizia Galeffi è relatore di tesi di laurea, tirocinio e dottorato di ricerca in ambito nazionale e internazionali. Collabora come Panel Editor con la rivista Food, Agriculture and Environment, ed è Referee di importanti riviste scientifiche internazionali. E' responsabile di attività di ricerca all'interno di progetti nazionali, valutatrice per la UE e per l'ENEA di progetti Biotecnologici e Biomedici e consulente dell'ufficio brevetti dell'Enea.

