



Biotechnologie ROSSE

madforscience.fondazionediasorin.it

LE NUOVE FRONTIERE DELLE BIOTECNOLOGIE ROSSE

Rosso è il colore delle biotecnologie che ruotano intorno alla salute dell'uomo e degli animali, un settore in continua evoluzione.

Dal brevetto del primo farmaco *biotech* nel 1982, l'insulina ricombinante, l'evoluzione scientifica in campo medico è stata inarrestabile, offrendo di anno in anno risposte innovative a problemi sanitari importanti. In circa 40 anni le applicazioni *biotech* in medicina sono passate dalla "semplice" replicazione di meccanismi cellulari naturali per la produzione di proteine terapeutiche o principi attivi, all'ingegnerizzazione di tessuti, all'editing genomico per la correzione di errori nel DNA, alla messa a punto di metodi diagnostici che sfruttano l'intelligenza artificiale. Tecnologie sempre più sofisticate e complesse, dunque, che si intrecciano con altre scienze come l'informatica, la bioingegneria, l'agronomia e consentono applicazioni terapeutiche in molti ambiti medici.

Vediamo dunque quali sono le principali tecniche oggi utilizzate, e le loro potenzialità future.

La base delle biotecnologie rosse poggia sulle conoscenze sempre più raffinate delle molecole della vita: il DNA, l'RNA, i loro meccanismi di interazione e di sintesi delle proteine, oltre al mondo di virus e batteri. Questi ultimi, infatti, sono spesso usati come modelli di studio, come biofabbriche o come vettori di porzioni di acidi nucleici che si vuole inserire

in cellule bersaglio, da curare.

Una delle tecniche più innovative per l'*editing* genomico è **CRISPR-CAS9** messa a punto da Charpentier e Doudna, ricercatrici Premi Nobel per la Chimica 2020. Questo sistema è stato originariamente scoperto nei batteri, nei quali serve come arma di difesa contro i virus, di cui tagliano, inattivandolo, l'acido nucleico. Il metodo CRISPR si basa sulla combinazione di due elementi: un enzima (Cas) e un RNA guida che si appaia al DNA del virus per indicare a Cas il punto in cui tagliare. Il DNA in questione viene dunque tagliato in un sito preciso e può così essere modificato, corretto, inserito in un altro gene, sia in vivo (direttamente nell'organismo ricevente) che *ex vivo* (all'esterno, su cellule vive coltivate in laboratorio).¹



1 - https://www.fisv.org/foto-articoli/71/varie/L_editing_del%20genoma_e_il_sistema_CRISPR-Cas9.pdf

Numerosi sono i gruppi di ricerca che stanno studiando come utilizzare CRISPR per combattere diversi tipi di tumori, malattie rare o infettive, e i primi frutti già si vedono, tanto che nel marzo 2023 è intervenuta al terzo *summit* internazionale sull'*editing* genomico umano di Londra la prima paziente curata con CRISPR. La donna ha ricevuto un trattamento specifico per combattere l'anemia falciforme, grazie alla modifica di cellule staminali ematopoietiche della paziente stessa, riprogrammate per produrre livelli elevati di emoglobina fetale (HbF) nei globuli rossi. Questa forma di emoglobina è ora in grado di trasportare l'ossigeno e di rimpiazzare così la forma adulta di Hb di cui la donna era carente.² Negli ultimi anni anche la molecola di **RNA** - considerata tradizionalmente subalterna al DNA - ha avuto un'importanza sempre crescente. Grazie ai vaccini prodotti per contrastare la pandemia di COVID-19 e all'importante investimento economico nel settore, recentemente sono stati fatti notevoli passi avanti, nonostante la ricerca in questo ambito sia attiva da circa 30 anni. L'acido ribonucleico messaggero o mRNA, a singolo filamento, si genera a partire dal DNA con un processo chiamato trascrizione, e ha la funzione di tradurre in proteine le informazioni genetiche presenti sul DNA, attraverso la sintesi proteica. Proprio per il ruolo di mediazione che svolge sul codice genetico, si è capito

oggi che l'RNA ha un potenziale altissimo dal punto di vista farmacologico.

Tra i farmaci a RNA vi sono naturalmente i vaccini, utilizzati largamente nel corso della pandemia per combattere SARS-CoV-2. I vaccini a RNA sono composti da un filamento sintetico di mRNA racchiuso in una nanoparticella lipidica che ha il compito di trasportarlo all'interno delle nostre cellule. Qui le cellule producono la proteina del virus che attiva il sistema immunitario umano, senza causare l'infezione virale. Oltre che per SARS-CoV-2, questa tecnica viene oggi studiata per lo sviluppo di vaccini per diverse altre malattie.³

Per potenziare le difese immunitarie si può ricorrere anche agli **anticorpi monoclonali** (MAB), molecole *biotech* prodotte in laboratorio a partire dai linfociti B estratti dalla milza del topo, e fuse con cellule tumorali del sangue (cellule di mieloma) che hanno la caratteristica di essere immortali. Queste nuove cellule diventano *ibridomi* in grado di formare un clone di cellule identiche, capaci di produrre quantità illimitate dello stesso anticorpo chiamato, appunto, monoclonale, che può essere estratto e purificato. Gli anticorpi monoclonali sono progettati per riconoscere specificatamente un unico antigene e si legano ad esso, neutralizzandolo. I MAB possono essere utilizzati per combattere malattie come infiammazioni, infezioni o tumori, possono essere legati (coniugati) a farmaci

2 - <https://www.osservatorioterapieavanzate.it/terapie-avanzate/editing-genomico/il-summit-sull-editing-di-londra-allontana-lo-spettro-di-hong-kong>

3 - <https://www.marionegri.it/magazine/vaccini-a-mrna>

o a molecole radioattive (**radioimmunoterapia**) per indirizzare con estrema precisione il principio attivo verso il suo bersaglio. Infine, possono essere impiegati per diagnosticare antigeni di agenti infettivi, quali virus e batteri, o marker specifici presenti sulle cellule tumorali. Gli anticorpi monoclonali possono essere inoltre impiegati in alcuni kit diagnostici quali, ad esempio, i test di gravidanza.⁴

Gli strumenti finora analizzati di ingegnerizzazione del DNA rientrano anche nell'ambito della **terapia genica**. Questa tecnica prevede di fornire all'organismo malato una copia corretta del gene difettoso, creata artificialmente in laboratorio, oppure un altro gene che possa compensarne il malfunzionamento.



Tra le applicazioni più promettenti della terapia genica vi sono il tumore al pancreas, la SMA - atrofia muscolare spinale- le malattie ereditarie della retina, l'emofilia A. Per quest'ultima, la Commissione Europea ha dato il via libera nel 2022 a un'innovativa terapia genica. I pazienti emofiliaci, che non sono in grado di produrre il Fattore VIII della coagulazione e sono costantemente a rischio di emorragie, hanno ora a disposizione un farmaco che fornisce il gene per la produzione di questa proteina. Il farmaco è un vettore basato sul virus adeno-associato ricombinante non replicante, che veicola il cDNA (DNA complementare) del gene del fattore di coagulazione umano VIII, con il relativo *promotore*, nelle cellule dei malati.⁵ Si tratta dunque di una terapia genica in vivo di tipo "one shot", ossia un'unica infusione endovenosa, in cui il gene terapeutico viene somministrato direttamente nell'organismo del paziente e non all'esterno, in cellule prelevate *ex vivo*.⁶ Se a dover essere modificati sono tessuti o interi organi, si può parlare di **medicina rigenerativa**, finalizzata allo sviluppo di terapie per riparare e ricostruire tessuti e organi compromessi da difetti congeniti, malattie, traumi o invecchiamento, attraverso le cellule staminali dei tessuti stessi.

Le **cellule staminali** sono quelle cellule che hanno la capacità unica di autorinnovarsi e di differenziarsi nei diversi tipi cellulari spe-

4 - <https://www.issalute.it/index.php/la-salute-dalla-a-alla-z-menu/a/anticorpi-monoclonali-mab#anticorpi-monoclonali-in-diagnostica>

5 - https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/roctavian-epar-product-information_it.pdf

6 - <https://www.osservatorioterapieavanzate.it/terapie-approvate/approvata-in-europa-la-prima-terapia-genica-per-l-emofilia-a>

cializzati che costituiscono il corpo umano. Le staminali, abbondanti nell'embrione e via via sempre meno presenti, sono indispensabili per la crescita e lo sviluppo dell'organismo e per la rigenerazione dei tessuti.

Appositamente preparate e selezionate, nella **terapia cellulare** le staminali possono agire in due diversi modi: possono colonizzare fisicamente il tessuto danneggiato, e successivamente differenziarsi in quel tipo cellulare, per ripristinarne la funzionalità, oppure agiscono rilasciando molecole che innescano meccanismi biochimici in grado di avere un effetto terapeutico sul tessuto danneggiato.

Tra le applicazioni più moderne delle staminali troviamo la **biostampa 3D** o *bioprinting*, in cui cellule prelevate direttamente dal paziente vengono utilizzate in una stampante 3D per generare strutture biologiche tridimensionali da trapiantare poi nel paziente stesso.

È il caso, ad esempio, del recente trapianto di orecchio stampato in 3D avvenuto in Texas⁷, o della stampante *Electrospider*⁸, sviluppata da un'azienda trevigiana in collaborazione con l'Università di Pisa, capace di ricreare tessuti biologici compatibili con l'essere umano grazie alla stampa di idrogel caricati con cellule del soggetto stesso. Questa tecnica è promettente anche per testare farmaci e prodotti per la cura del corpo in ambito farmacologico e cosmetico, evitando la spe-

rimentazione animale e personalizzando efficacemente le cure sul paziente.

A fianco di cellule animali, batteriche e fungine, le moderne biotecnologie vedono anche l'utilizzo di **cellule vegetali**. In particolare, un ruolo sempre crescente nell'ambito delle biotecnologie per la salute è rappresentato dal **Plant Molecular Farming** o PMF, un processo che utilizza i vegetali come bioreattori per produrre molecole complesse di origine umana come ormoni, enzimi e vaccini.

Si tratta di un approccio biotecnologico più economico e rapido rispetto a quello tradizionale, che richiede materie prime poco costose, e consente di operare in condizioni non sterili e con un rischio minimo per la salute umana.

Nel PMF il DNA delle piante è opportunamente modificato inserendo il gene codificante per la proteina che si vuole produrre. Le tecniche di **trasfezione** più utilizzate per creare queste piante transgeniche possono essere mediate da *Agrobacterium* o prevedere la trasformazione diretta con DNA, utilizzando tecniche biolistiche, elettroporazione, permeabilizzazione di protoplasti mediata da specifiche sostanze chimiche.⁹

Nel primo caso si utilizzano batteri gram-negativi del genere *Agrobacterium* che vivono nel suolo, sfruttando la loro naturale capacità di trasferire orizzontalmente geni per trasportare parte del loro materiale genetico

7 - <https://www.avvenire.it/vita/pagine/organi-e-tessuti-c-la-stampa-3d>

8 - <https://aido.it/la-stampante-3d-che-fotocopia-tessuti-e-organi-per-trapianti-parte-da-treviso-la-medicina-del-futuro/>

9 - https://www.uniba.it/it/ricerca/dipartimenti/bioscienze-biotecnologie/didattica/orientamento/orientamento-in-ingresso/TRACCIABILITA_OGM_Prof.ssaMontemurro.pdf

accessorio nelle piante, dove causano tumori di varia natura. Grazie alle approfondite conoscenze di genetica e fisiologia vegetale, i ricercatori sono in grado di inserire alcuni geni di interesse nella breve sequenza di DNA plasmidico del batterio (T-DNA), i quali sono poi integrati nel DNA del tessuto vegetale infettato, venendo successivamente moltiplicati ed espressi come se appartenessero alla pianta stessa.

Con queste tecniche sono state prodotte diverse sostanze bioattive, che vanno da farmaci per malattie rare come la sindrome di Hurler¹⁰, al collagene¹¹, ad anticorpi monoclonali utili sia come immunoterapici per la cura di tumori e artrite reumatoide, che per la diagnostica, ad esempio di SARS-CoV-2.¹²

Alcune di queste ricerche si sono sviluppate nell'ambito del progetto finanziato dall'UE Pharma-Factory, per migliorare i sistemi basati sulle piante destinati alla fabbricazione di prodotti medicinali, veterinari e diagnostici, a conclusione del quale il consorzio ha anche prodotto e diffuso gratuitamente un kit di *plant molecular farming* destinato ai ricercatori e alle scuole secondarie¹³.

Sempre basata sull'utilizzo di *Agrobacterium*, la coltura in sospensione di cellule vegetali è una valida alternativa alla coltivazione in

serra delle piante modificate, risultando particolarmente rapida ed economica. In questo caso le cellule, ad esempio di carota, sono private delle pareti cellulari, opportunamente modificate genericamente e coltivate in un mezzo liquido. Con questo metodo, ad oggi sono stati prodotti e approvati due biofarmaci: la taliglucerasi-alfa per il trattamento della malattia di Gaucher umana, malattia lisosomiale genetica rara, ed un vaccino contro la Malattia di Newcastle aviaria¹⁴.

A proposito di quest'ultimo, c'è da notare come le piante siano ritenute promettenti sistemi anche per produrre antigeni a scopo vaccinale. Attualmente vi sono allo studio diversi vaccini di origine vegetale, come quello per chikungunya, dengue (o "febbre gialla"), ebola, influenza, zika, colera e epatite B, tutti antigeni espressi nelle piante del tabacco *Nicotiana benthamiana* e *N. tabacum*. A uno step precedente di ricerca si trovano invece i cosiddetti vaccini commestibili, ossia prodotti in piante eduli opportunamente modificate e selezionate.¹⁵



10 - <https://cordis.europa.eu/article/id/443399-plant-produced-medicines/it>

11 - https://www.enea.it/it/sequici/events/biotechweek_26set2018/Donini_26set2018.pdf

12 - <https://www.cnr.it/it/news/10053/plant-molecular-farming-al-servizio-del-covid-19>

13 - <https://cordis.europa.eu/article/id/443399-plant-produced-medicines/it>

14 - [https://www.missionescienza.it/plant-molecular-farming-piante-bioreattori/#:~:text=Con%20Plant%20Molecular%20Farming%20\(PMF,piante%20acquatiche%2C%20muschi%20e%20alghe.](https://www.missionescienza.it/plant-molecular-farming-piante-bioreattori/#:~:text=Con%20Plant%20Molecular%20Farming%20(PMF,piante%20acquatiche%2C%20muschi%20e%20alghe.)

15 - <https://www.biopills.net/plant-molecular-farming/#Referenze>

La incredibile capacità dei vegetali di rinnovarsi e differenziarsi in nuove forme cellulari desiderate si basa sul fenomeno della **totipotenza** delle cellule vegetali, cioè sulla capacità tipica di una o poche cellule di rigenerare un'intera pianta, a differenza delle cellule animali che possono rigenerare un organismo solo a partire da cellule della linea germinale. Infatti, lo stadio di differenziazione dei tessuti vegetali è reversibile e può essere manipolato in vitro variando il rapporto di due ormoni vegetali che regolano proliferazione e differenziamento, *auxina* e *citochinina*. Con tecniche di micropropagazione in vitro, utilizzando degli espianti di cellule vegetali, è possibile indurre la perdita del programma differenziativo, rendendo appunto totipotenti le cellule. Successivamente si somministrano gli ormoni secondo un rapporto specifico; tale rapporto è infatti di fondamentale importanza per indirizzare la rigenerazione verso la produzione di germogli o verso la differenziazione delle radici, ed è specifico per ciascuna specie vegetale. Da queste si possono poi ottenere nuovi germogli, le plantule -identiche alla pianta madre-, o calli, ossia colture di tessuti indifferenziati, che possono essere mantenute per lungo tempo in vitro, e da cui possono essere rigenerate piante intere e fertili variando il rapporto di ormoni.¹⁶

Proprio per questa loro proprietà rigenerativa, le **cellule staminali vegetali** sono sfrut-

tate nell'ambito della **cosmesi**, in quanto è dimostrato che possono interagire con le cellule dell'epidermide rallentando l'invecchiamento di cute e capelli, oltre che riuscendo a combattere la formazione di radicali liberi. A partire da ricerche sui benefici di una varietà di mela svizzera, gli studi si sono allargati poi alla stella alpina, alla budleja o albero delle farfalle *ricco di verbacosiide*, un potente antiossidante e foto-protettivo, a mirtillo, fragola e bacche di lampone, contenenti *antociani*, efficaci antiossidanti ad attività anti-infiammatoria. Le staminali vegetali vengono prelevate da frutti, foglie, radici o gemme della pianta, a seconda del principio attivo che si intende raccogliere, e vengono fatte moltiplicare in appositi terreni di coltura, per poi estrarne la sostanza desiderata.¹⁷ Si tratta di una promettente linea di ricerca che intende puntare anche alla valorizzazione degli scarti delle industrie agroalimentari, attraverso tecnologie green in un'ottica di economia circolare, e di sostenibilità ambientale.

Dai vegetali, attraverso lieviti, batteri e animali, il mondo delle biotecnologie rosse sta sperimentando ambiti di ricerca e produzione diversificati per affrontare le sfide sempre nuove che la medicina ci pone, e garantire la salute a tutti gli abitanti del pianeta.

16 - https://www.uniba.it/it/ricerca/dipartimenti/bioscienze-biotecnologie/didattica/orientamento/orientamento-in-ingresso/TRACCIABILITA_OGM_Prof.ssaMontemurro.pdf

17 - <https://www.ifarma.net/cellule-staminali-vegetali-cosmetici-antiaging/>