

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Scienze del Farmaco

Corso di Laurea Specialistica in

FARMACIA



Tesi di Laurea Specialistica in Farmacia

Recenti applicazioni del Phage Display nel processo
di drug discovery di farmaci peptidici.

Relatore: Prof. Mattia Sturlese

Laureanda: Marku Stela

Matricola 523232

Anno accademico: 2021-2022

Indice

1.Abstract	pag5
2.Capitolo 1. Il Farmaco, Ricerca e Sviluppo.....	pag6
2.1 Definizione del farmaco.....	pag 6
2.2 Come si progetta un farmaco.....	pag 7
2.3 Ricerca e sviluppo di un farmaco.....	pag 7
2.4 Fase di drug discovery preclinica.....	pag 8
2.5 Fase pre-clinica	pag 11
2.6 Studio clinico.....	pag 16
3.Capitolo 2. Phage Display	pag 19
2.1 Introduzione	pag19
2.2 Batteriofagi.....	pag20
2.3 Batteriofago M13.....	pag23
2.4 Vettori e Librerie di phage display.....	pag26
2.5 Librerie di M13.....	pag28
2.6 IL metodo di selezione dei fagi.....	pag30
2.7 Strategie di base del biopanning.....	pag31
2.8 Screening di phage display.....	pag34

4. Capitolo 3. Applicazioni di phage display nel campo farmaceutico	
.....	pag37
3.1 Introduzione.....	pag37
3.2 Visualizzazione fagica di peptidi naturali.....	pag38
3.3 Visualizzazione fagica di peptidi casuali.....	pag39
3.4 Visualizzazione fagica di peptidi e domini proteici.....	pag42
3.5 Dai peptidi ai farmaci via phage display.....	pag46
5. Capitolo 4 Nuovo inibitore C3 mirato Pegcetacoplan per l'emoglobinuria parossistica notturna.....	pag49
4.1 Introduzione.....	pag49
4.2 Fisiopatologia e manifestazioni cliniche di EPN.....	pag50
4.3 La scoperta di APL-2 /Pegcetacoplan.....	pag53
4.4 L'approvazione di Pegcetacoplan.....	pag55
4.5 Proprietà farmacologiche del Pegcetacoplan.....	pag56
6. Conclusione	pag60
7. Bibliografia, Sitografia.....	pag61

1. Abstract

Il presente elaborato di tesi spiega il processo della ricerca e dello sviluppo dei farmaci e soprattutto esprime in forma abbastanza dettagliata la tecnica di phage display nel processo di drug discovery. I batteriofagi sono virus che infettano i batteri, hanno acquisito un ruolo molto significativo nella biotecnologia, questo grazie alla loro biologia ampiamente studiata e alle numerose caratteristiche vantaggiose. L'applicazione più nota dei batteriofagi è il phage display tecnica che si riferisce all'espressione di peptidi o proteine estranee al di fuori del virione fagico, come fusione con una delle proteine del rivestimento fagico. La tecnica di phage display è stata scoperta nel 1985 da George P. Smith il quale nel 2018 viene premiato insieme a Sir Gregori P. Winter, con il premio Nobel per la chimica "per la phage display di peptidi e anticorpi". Nel corso degli anni sono stati scoperti un grande numero di target derivanti da phage display alcuni già approvati nel campo clinico e altri ancora in percorso di studio. L'adalimumab è il primo anticorpo monoclonale completamente umano derivato da phage display, è stato approvato nel 2002 da FDA. È un farmaco con azione antinfiammatoria, un inibitore del TNF (Tumor Necrosis Factor). Questo farmaco è stato considerato il farmaco più importante al mondo e ha avuto un grande successo nel campo farmaceutico. Negli ultimi anni sono state scoperte una varietà di peptidi derivanti da phage display uno di loro è stato preso in considerazione in seguito del materiale di questa tesi. Si tratta di Pegcetacoplan (Ampaveli) un farmaco della famiglia di farmaci peptidici, indicato nel trattamento di pazienti adulti con emoglobinuria parossistica notturna (EPN). È un inibitore del componente C3 del complemento che può portare ad un miglioramento significativo del livello di emoglobina e di altri risultati clinici alla 16ª settimana di cura. L'arrivo di pegcetacoplan in clinica segna il culmine del lungo, duraturo e prolifico percorso scientifico di John Lambris nella scoperta, nell'ottimizzazione e nel progresso clinico degli inibitori C3 a base di compstatina.

CAPITOLO 1: IL FARMACO, RICERCA E SVILUPPO

1.1 Definizione del Farmaco

La parola farmaco proviene dal termine “pharmakon” proveniente dall’antica Grecia e indica la duplice natura di una sostanza che con la sua attività può avere degli effetti curativi per, oppure può essere nociva o addirittura tossica. Nella lingua inglese è stata conservata la doppia connotazione chiamando il farmaco con il termine DRUG che significa sia farmaco che droga, farmaco per quanto riguardo i suoi effetti curativi e droga per i suoi effetti nocivi e tossici.

Ippocrate di Kos, medico dell’antichità Grecia del 460 a.C definì il farmaco un preparato che determina sull’organismo un’azione capace di modificare lo stato esistente. Oggi l’effetto indotto dal farmaco all’organismo è utilizzato per curare, prevenire, diagnosticare le patologie oppure per comprendere il funzionamento dei processi fisiologici.

Nel percorso della storia la definizione del farmaco è stata modificata diverse volte ma ha sempre mantenuto nel suo interno le sue principali caratteristiche, qualità, efficacia e sicurezza. Oggi il farmaco viene definito come sostanza o associazione di sostanze che possa essere utilizzata sull'uomo o somministrata all'uomo allo scopo di ripristinare, correggere o modificare funzioni fisiologiche, esercitando un'azione farmacologica, immunologica o metabolica, ovvero di stabilire una diagnosi medica [1]. Il farmaco è composto da **principio attivo** che è il componente dei medicinali da cui dipende la sua azione curativa, cioè il medicinale vero e proprio, e dagli **eccipienti** che sono invece componenti inattivi del medicinale, privi di ogni azione farmacologica. Hanno la funzione di proteggere il principio attivo dagli agenti esterni che potrebbero danneggiarlo (il caldo, il freddo, l’umidità o altre sostanze chimiche), di aumentare il volume per consentire la preparazione di compresse o di qualsiasi altra forma farmaceutica di dimensioni accettabili, di rendere stabili soluzioni o sospensioni evitando la sedimentazione del principio attivo sul fondo dei contenitori e di facilitare l’assorbimento del principio attivo nell’organismo, di rendere il sapore dei medicinali più gradevole, ecc [2].

1.2 Come si progetta un farmaco

Generalmente un nuovo farmaco nasce dall'individuazione, da parte dei ricercatori, di un possibile "bersaglio farmacologico", ossia un meccanismo o un processo biologico su cui poter intervenire per curare o prevenire una malattia. Determinare quali siano le caratteristiche necessarie perché una nuova molecola sia attiva rappresenta un processo molto difficile, che porta ad ottenere una serie di possibili candidati, definiti "composti guida", precursori del futuro principio attivo di un farmaco [3]. L'identificazione di nuove entità chimiche da sottoporre a sviluppo clinici quali potenziali farmaci è basata attualmente su un approccio multidisciplinare che comprende discipline chimiche, chimico-fisiche, biologiche e farmacologiche [4]. La comprensione di meccanismi biochimici sottesi all'azione del farmaco è di fondamentale importanza per il successo di un progetto di ricerca [5]. I recenti progressi scientifici e tecnologici nei campi della biotecnologia e dell'informatica hanno impresso un'enorme accelerazione al processo di scoperta di nuovi Lead per l'avvio dell'attività di ricerca e sviluppo (R&S) preclinico (LEAD Discovery). I progressi nel campo della biologia molecolare hanno reso possibile il saggio rapido e automatizzato (High Throughput Screening) di numerosissime molecole nella ricerca di nuovi LEAD. Analogamente nel campo informatico, sono disponibili banche dati contenenti da decine fino a milioni di molecole, le quali possono essere sottoposte a una sorta di screening biologico in silico (Virtual Screening) [6]. Queste due tecniche sono sempre più spesso in combinazione. In pratica, le banche dati sono sottoposte a una sorta di scrematura adoperando descrittori molecolari o metodi docking (procedura di simulazione dell'interazione tra farmaco e il suo bersaglio molecolare) come filtri per selezionare un minor numero di molecole che hanno maggiori probabilità di manifestare l'attività biologica desiderata [7].

1.3 Ricerca scientifica e sviluppo di un farmaco

Per molto tempo i farmaci sono stati realizzati partendo dalla identificazione dei loro principi attivi oppure la loro scoperta è stata del tutto casuale. Dall'inizio del xx secolo dove le librerie chimiche che possono avere molecole di origine naturali

o estratti da tessuti oppure liquidi biologici, sono state sottoposte in screening su cellule in coltura o su organismi viventi, lo scopo era quello di riuscire a identificare sostanze dotate di effetto terapeutico. Con il ricorso agli High Throughput screening (HTS screening ad alta resa, elevato flusso e automazione) di grandi librerie è possibile capire se una determinata molecola interagisca o crea legami con uno specifico bersaglio biologico(target). Le molecole che in questi screening reagiscono con un target vengono poi testate sui diversi ambienti, su culture cellulari, organi isolati, e come processo finale in modelli animali, per verificare che l'interazione con il target venga seguita da efficacia. La ricerca e lo sviluppo di un farmaco è un processo molto lungo può comprendere un periodo anche di dodici-quindici anni, ed è un processo costoso e molto complesso perché per la realizzazione coinvolge centinaia di persone con competenza professionali diverse. Questo processo viene sviluppato in diverse fasi sequenziali ma può capitare che queste fasi si possano sovrapporsi. Particolarmente possiamo riconoscere due fasi. La prima fase quella di Lead Discovery che il suo obiettivo è di identificare molecole potenzialmente attive per poi essere usate successivamente. La seconda fase rappresenta la fase preclinica e clinica. Una volta indentificato il LEAD ovvero la molecola selezionata tra un insieme di molecole candidate (HIT), quella con maggiore attività, viene testato in vitro e poi in vivo [8].

1.4 Fase di Drug Discovery preclinica

La Drug Discovery permette l'identificazione di molecole candidate, la loro sintesi, la caratterizzazione, gli screening e i saggi di efficaci terapeutica. (8) Tale processo può essere a sua volta suddiviso in tre fasi:

- Target to HIT (La molecola più efficace scelta tra un insieme di molecole candidate)
- Hit to LEAD (H2L)
- LEAD optimizatin. [9]

Il target to HIT e la fase della validazione del bersaglio biologico che in inglese sarebbe il TARGET VALIDATIUM. Generalmente il bersaglio biologico (target) è definito come cellula o struttura molecolare che viene coinvolta nella patologia di interesse. Subito dopo si entra nel passaggio dell'identificazione di molecole attive sul target attraverso le tecniche di screening ad alta resa ed elevato flusso e automazione, dove le grandi librerie di entità chimiche vengono testate per la capacità di integrazione con il target. La fase dell'hit to LEAD subentra quando abbiamo ottenuto degli HIT potenzialmente attivi riguardo al target in questione, dove per ciascuno di questi HIT vengono effettuati dei test e dei saggi. L'Hit più promettente diventerà oggetto di sviluppo. L'ultima è la fase di LEAD optimization, dove la molecola viene sintetizzata ai fini del successivo avvio di test preclinici.

Tra le moderne piattaforme di screening è possibile distinguere le seguenti tipologie:

- a) High throughput screening (HTS)
- b) Urta-high throughput screening (u-HTS)
- c) High-content screening (HCs)
- d) Screening in silico.
- e) screening virtuale (SV)

a) *Gli High throughput screening (HTS)* sono delle tecniche che rappresentano l'evoluzione automatizzata e su larga scala di saggi atti ad identificare un ligando di un target o un composto o con determinata attività biologica. Queste tecniche possono lavorare ventiquattro su ventiquattro e sette giorni su sette, permettendo di studiare migliaia di molecole al giorno. Le Hits cioè le molecole che effettuano interazioni interessanti, e che danno un segnale credibile dell'interazione tra il ligando e il target biologico, vengono evidenziati da un potente sistema informatico che valuta i risultati a valle della sequenza di operazioni di screening. HTS opera in sinergia con tecnologie avanzate alcune di loro sono la robotica, l'informatica, l'automazione, tecnologie di dispensazione dei fluidi (volume < 1µL) ecc. Grazie a questi sviluppi tecnologici e informatici è stato possibile testare con gli screening a

elevata produttività, migliaia di molecole sintetizzate mediante la chimica combinatoria in un breve arco di tempo.

b) *Ultra-High throughput screening (u-HTS)* è una tecnica molto simile alla tecnica HTS, ancora oggi il confine tra queste due tecniche è discusso nel panorama scientifico internazionale, ma si potrebbe comunque dire che la u-HTS è una versione più capace complessiva e produttiva di HTS.

c) *L'High-content screening (HCS)* è la piattaforma che rappresenta il più avanzato screening in termini di cellule testate, di volumi di liquidi dispensati e di tempo impiegato. Questa piattaforma ha migliore velocità di screening grazie all'uso della tecnica microfluidica. Con HCS è possibile sottoporre a screening migliaia di reazioni enzimatiche in sole poche ore.

d) *Screening in silico*, tecnica che permette la descrizione di fenomeni di natura chimico-biologica, riprodotti non in provetta o in un essere vivente ma in una simulazione matematica al computer. Queste simulazioni coinvolgono macromolecole biologiche, come, proteine, polisaccaridi, acidi nucleici, ma possono presentare delle limitazioni che sono dovute alle semplificazioni adottate dai modelli fisico-matematici che vengono utilizzati per la realizzazione dei sistemi simulati.

Questa piattaforma consente di interpretare con maggiore precisione le conoscenze derivate da analisi sperimentali che applicano dei metodi di calcolo altamente moderni. Lo screening in silico è un approccio molto più veloce e economico, rispetto allo screening sperimentale. Il numero di molecole da indagare con la tecnica di screening in silico può arrivare alle decine o alle migliaia di omologhi, e non è necessario sintetizzarle in laboratorio per misurare le loro caratteristiche. La simulazione dei dati in silico riduce in maniera considerevole il numero di molecole da sintetizzare per le applicazioni. In tal modo ci si concentra sulle molecole che dallo screening computazionale danno in risultati più convincenti e desiderati per le applicazioni da eseguire. Lo screening in silico dà dei notevoli benefici anche in termini di costo e di tempo.

e) *Lo screening virtuale (SV)* è una strategia molto significativa nell'identificazione nei tempi relativamente brevi degli HIT in un gruppo di composti. L'SV viene

affermata come tecnica fondamentale nella fase iniziale del processo di scoperta di nuovi farmaci, e si concentra sulla progettazione e l'ottimizzazione di librerie combinatorie che permettono di arricchire le librerie di molecole già disponibili, presenti nei repository di composti di proprietà aziendale o acquisiti da fornitori specializzati [10]. Inoltre, questa tecnica permette di selezionare i composti presenti nei database interni, valutare le molecole acquistate da database esterni e scegliere quale/i molecola/e deve /devono essere sintetizzate a valle [11]

1.5 Fase pre-clinica

Ancor prima di effettuare la verifica in un uomo sano, della tollerabilità e gli effetti di una nuova molecola con attività farmacologica, la legislazione obbliga lo

Svolgere di una serie di indagini in laboratorio (in vivo) su degli animali. Gli animali di laboratorio sono di due specie, una roditrice e una non roditrice. Queste indagini in vivo vengono adoperate per confermare e definire le caratteristiche farmacotossicologiche e la sicurezza d'impiego. I requisiti regolatori, inclusi gli studi di tossicità e sicurezza nell'animale (Toxicology e Safety Pharmacology), sono riportati e illustrati nelle linee guida e nei "Points to Consider" emessi e aggiornati dalle Autorità Regolatorie nazionali [12], precisamente in Italia dalla AIFA (Agenzia Italiana del Farmaco). I test regolatori di tossicità e sicurezza devono essere condotti in conformità alle Norme di Buona Pratica di Laboratorio (BPL) o, emanate dalle Autorità in apposite guidelines ma anche discusse e concordate con l'industria [13]. Queste norme bisogna rispettarle obbligatoriamente sia per la fase di registrazione, sia nel caso dove si vuole ottenere l'autorizzazione a sperimentare il nuovo farmaco nell'uomo. Le BPL regolano, tramite SOP (procedure operative standard), il modo in cui tutte le fasi degli studi regolatori, in vitro e sugli animali, devono essere descritte in protocolli dedicati, registrate e realizzate, ispezionate e archiviate da personale adeguato, e relazionate in report. Tutta la documentazione cartacea e quella su supporto elettronico che è relativa allo studio realizzato in rispetto assoluto delle BPL, deve essere conservata in archivio con accesso controllato e gestito da parte delle persone adeguatamente preparate. Il controllo

delle BPL affidato al personale adeguatamente preparato deve permettere la ricostruzione di tutto lo studio pre-clinico anche a distanza di anni.

Nella fase pre-clinica le indagini che si effettuano in vitro o nell'animale riguardano alla valutazione degli:

- a) Studi di Tossicologia
- b) Studi di Genotossicologia
- c) Studi di Farmacodinamica
- d) Studi di Farmacocinetica

a) Gli studi di tossicologia necessari e il loro disegno sperimentale sono, quindi, frutto di una continua interazione, durante la fase di programmazione degli studi pre-clinici, tra tossicologi, farmacologi, medici clinici e Project Manager della casa farmaceutica [14].

Le sperimentazioni tossicologiche hanno lo scopo di mettere in evidenza le caratteristiche degli effetti

tossici del farmaco e di tentare di identificare i possibili effetti dannosi nelle condizioni di impiego previste

nell'uomo. Gli studi tossicologici si denominano in base alla durata della somministrazione:

- Studi di tossicità acuta;
- Studi di tossicità a medio termine (sub-acuta: 2-4 settimane, sub-cronica: 13 settimane)
- Studi di tossicità cronica (6-9-12 mesi)
- Studi di cancerogenesi (18-24 mesi)
- Studi di tossicologia della funzione riproduttiva [15]

-Nella tossicità acuta l'attuale regolatoria è quella di determinare la massima dose tollerata (MTD). Oltre la MTD sono da determinare altri parametri come: Lowest

Observed Adverse Effect Level (LO(A)EL) ovvero il più basso livello di esposizione a un farmaco in cui si osserva un effetto, e il No Observed Adverse Effect Level (NO(A)EL), cioè il più alto livello di esposizione in cui non si osservano effetti tossici [16]. Agli animali viene somministrata una dose unica o ripetuta entro ventiquattro ore con dosi crescenti della molecola in esame, e vengono osservati per due settimane. Si registrano eventuali mortalità, la natura e l'intensità dei fenomeni tossici, clinici o altri tipi di fenomeni comportamentali attraverso il test di Irwin. Questo test non valuta solo gli effetti della molecola in esame sul sistema nervoso centrale (SNC) e vegetativo, cardiovascolare e respiratorio, ma valuta anche possibili variazioni nel comportamento spontaneo dell'animale come (tremori, aggressività, salivazione, vocalizzazione e coordinazione motoria). Alla fine dello studio gli animali si sottopongono all'esame di necropsia cioè vengono esaminati e pesati gli organi e se e necessario si fissano in formalina per effettuare l'esame istopatologico. Uno degli scopi della tossicità acuta è quello da identificare l'effetto tossico specifico e dei bersagli biologici e anche di individuare le dosi da somministrare nei test di tossicologia a breve termine.

-Studi di tossicità a medio termine sono studi che vengono condotti in entrambi i sessi e su due specie. Uno studio viene condotto su animali roditori quali topo o ratto e un altro studio viene condotto su animali non roditori (cane). Normalmente la somministrazione del farmaco è giornaliera per un periodo di tempo 2-4 settimane e sarebbe quella sub-acuta o per 13 settimane che sarebbe quella sub-cronica. Si effettua la stessa procedura sia nell'animale roditore che quello non roditore. La durata del tempo viene commisurata con durata del tempo della somministrazione del farmaco prevista per la terapia umana. Tra gli scopi degli studi di tossicità a medio termine, c'è quello di definire la LOEL e la NOEL. Nel corso di questi studi vengono eseguiti in più occasioni anche altri rilievi, specificamente richiesti dalle Autorità Regolatorie [17]. Tra i più importanti, si possono citare i seguenti: -l'esame dei formulati, per verificare l'esattezza della dose somministrata; - gli esami di tossico-cinetica, per dimostrare l'assorbimento del prodotto, come si distribuisce nel torrente circolatorio e se la sua distribuzione e i suoi livelli variano o meno nel corso dello studio; - esami di immuno-tossicologia, per valutare se il prodotto è in grado di modificare la normale risposta immunitaria dell'organismo animale [18]. Solo per prodotti biotecnologici (proteine ricombinanti

di natura umana, quindi potenzialmente antigeniche per l'animale), è anche necessario valutare se il sistema immunitario dell'animale genera una risposta anticorpale nei confronti della proteina in esame. Inoltre, un'altra chiara finalità degli studi sub acuti, è quella di dare indicazioni sui livelli di dosaggio del prodotto da somministrare nei successivi studi sub-cronici e cronici [19].

-Studi di tossicità cronica, anche questi studi vengono condotti sia su animale roditore e non roditore ed in entrambi i sessi. Le somministrazioni del prodotto in esame vengono effettuate in maniera giornaliera. La durata di questo studio è di 6 mesi nell'animale roditore e dai 6-9 mesi nei non roditori. Vengono somministrate almeno tre dosi comprese tra un livello non tossico e uno molto più alto, tale comunque da provocare sicuramente una risposta tossica nel corso della somministrazione ripetuta [20]. Deve essere effettuata la stessa via di somministrazione prevista in terapia umana. Nella tossicologia cronica possiamo evidenziare lo scopo della determinazione della LOEL e della NOEL

-Studio di cancerogenesi, hanno una durata di 18-24 mesi, sono studi che valutano potenziali tumorigenici del prodotto in esame. I test per la cancerogenesi si effettuano quando abbiamo in esame un farmaco che la sua somministrazione all'uomo è stata prevista per un periodo pari o superiore a sei mesi, quando la classe farmacologica della sostanza risulta sospetta, quando la sostanza si accumula nell'organismo e quando abbiamo almeno un test di mutagenesi con un risultato dubbio. Questi studi vengono eseguiti sia nel topo che nel ratto in entrambi i sessi. Si somministrano almeno tre dosi di prodotto in esame, la frequenza di somministrazione è giornaliera e la via è uguale alla via di somministrazione prevista per la terapia umana. Lo scopo principale è il rilevamento di sviluppo di masse tumorali.

-Studi di tossicologia della funzione riproduttiva, è lo studio degli effetti che la molecola in esame può avere sulla funzione riproduttiva dallo sviluppo dei gameti, all'impianto dell'embrione, allo sviluppo degli organi e degli arti nei feti fino alla nascita e allattamento. Questo studio si articola in tre fasi:

-segmento 1 riguarda agli studi di fertilità maschile e femminile

-segmento 2 riguarda agli studi di sviluppo dell'embrione-fetale o teratogenesi

-segmento 3 riguarda agli studi di sviluppo peri e post-natale.

Gli studi per lo sviluppo embrio-fetale si eseguono in una specie non roditrice. Gli altri invece si eseguono su una specie roditrice. La conduzione di tutti questi studi è obbligatoria ai fini regolativi, ma ogni singolo studio può essere condotto a tappe diverse, in funzione della progressione degli studi clinici nell'uomo [21]. La somministrazione del prodotto da esaminare generalmente è giornaliera mentre la durata varia dal tipo di studio. Negli studi di fertilità si trattano i ratti, sia maschi che femmine, per alcune settimane prima dell'accoppiamento per verificare se il prodotto influenza lo sviluppo degli spermatozoi e degli oociti, fino al completamento dell'impianto degli embrioni nell'utero, al sesto giorno post-coito, negli studi di sviluppo embrio-fetale si trattano le madri gravide per tutto il periodo dell'organogenesi dal sesto al diciassettesimo-diciottesimo giorno post-coito (per verificare se il prodotto influenza il normale sviluppo degli organi e apparati del feto, inducendo effetti teratogeni), negli studi di sviluppo peri e post-natale si trattano le ratte gravide dal sesto giorno post-coito, fino allo svezzamento della prole, al ventesimo giorno post-parto (per verificare gli effetti del prodotto sulla gestazione e sulla prole, identificata come F1, durante l'allattamento [22])

b) Studi di genotossicologia, sono studi che riguardano al potenziale della molecola in esame di interagire con il DNA, interazione che può indurre mutazioni del materiale genetico. Una sostanza che interagisce col DNA è potenzialmente un prodotto mutageno che, per questa sua caratteristica, può danneggiare il DNA e risultare, quindi, cancerogeno e/o teratogeno [23]. Generalmente la mutagenesi non viene richiesta per una molecola di origine biotecnologica, che ha delle dimensioni delle macromolecole proteiche, che riesce ad entrare nel citoplasma cellulare ma comunque non riesce a superare la membrana nucleare per interagire con il DNA. Ciò non toglie che in un determinato caso di prodotto biotecnologico non sia necessario condurre alcune prove di mutagenesi.

c) Studio di farmacodinamica è lo studio che completa la fase pre-clinica dello sviluppo di un farmaco. Si divide in due categorie la farmacodinamica speciale e la farmacodinamica generale. Farmacodinamica speciale effettua la valutazione degli effetti farmacologici in diversi modelli di animali in confronto a farmaci noti di riferimento. Si usano animali sani negli quali viene indotta una patologia

sperimentale oppure animali geneticamente predisposti a esprimere certe patologie come ipertensione, obesità, neoplasie, arteriosclerosi ecc. Farmacologia generale e lo studio per la valutazione, a seguito di somministrazione singola di 3 diversi livelli di dose e per via prevista nella terapia umana del suo impatto su vari organi e sistemi vitali.

d) Studio di farmacocinetica, studia la dinamica di assorbimento, distruzione, metabolismo ed escrezione della sostanza in esame. Le vie di somministrazione sono: endovenosa che si fa sempre per assicurare la massima esposizione, intraperitoneale, orale, cutanea, oculare, respiratoria, intramuscolare. Con questo studio si studia il prodotto anche per le sue interazioni con strutture biologiche e la sua compartimentazione tissutale, si valuta se induce il proprio metabolismo epatico e/o di altri farmaci co-somministrabili [24]. Gli studi di farmacocinetica sono basilari per determinare le dosi e la via di somministrazione nelle varie specie animali per poi estrapolare informazioni per la somministrazione del farmaco sull'uomo. Alla fine della fase R&S pre-clinica se la molecola in esame supera tutte le prove soprannominate, viene introdotta come prodotto candidato per la somministrazione nel volontario uomo sano in fase clinica 1, fase dove si valuta la tollerabilità e la farmacocinetica.

1.6 Studio clinico

Il passaggio dalla fase di R&S pre-clinica alla fase clinica richiede l'autorizzazione dalla parte dell'ente regolatoria nazionale per la sperimentazione della molecola in esame, sull'uomo. In Italia l'ente regolatoria è AIFA (Agenzia Italiana del Farmaco) . Generalmente lo studio clinico si svolge in centri clinici autorizzati o ospedali dove viene monitorato regolarmente da personale adeguato. Tutti i dati sperimentali farmaco-tossicologico e quelli del profilo farmaceutico della sostanza in studio vengono trascritti su un dossier che in fine verrà presentato alla autorità sanitaria per ottenere AIC (l'autorizzazione dell'immissione nel commercio). Lo studio clinico di un farmaco viene suddiviso in quattro fasi:

- a) fase I
- b) fase II
- c) fase III
- d) fase IV

La suddivisione in fasi è stata introdotta dal FDA (Food and Drug Administration) che è l'autorità di controllo federale negli USA. Con una finalità principalmente pratica.

a) fase I: È la fase dove il nuovo farmaco viene somministrato per la prima volta sull'uomo. Gli studi nella fase I possono essere effettuati su volontari sani ricoverati presso i centri autorizzati. Il volontario sano deve essere di norma un soggetto giovane e non deve presentare nessuna patologia e non deve assumere altri farmaci durante lo studio. In alcuni casi come per i chemioterapici antineoplastici oppure altri farmaci biotecnologici o per terapia genica non è consigliabile effettuare lo studio su soggetti sani, perché si potrebbero accusare degli importanti effetti dannosi e imprevedibili. Per questo motivo si va a ricorrere a pazienti nei quali sia ipotizzabile un futuro impiego terapeutico del farmaco. Lo scopo degli studi della fase I è di definire le dosi con cui avviare gli studi terapeutici e di verificare come il farmaco si comporta nell'organismo umano. Quindi l'obiettivo di questa fase è di valutare la tollerabilità, farmacocinetica, il metabolismo e la farmacodinamica del nuovo farmaco sull'uomo.

b) fase II: Nella fase II si effettua al paziente la prima somministrazione accuratamente selezionata durante la fase I. I studi della fase II sono studi orientati ad acquisire informazioni come: l'identificazione del range delle dosi efficaci utilizzabili, definizione della posologia, durata del trattamento a breve termine, tollerabilità a breve termine, identificazione preliminare delle controindicazioni e la farmacocinetica in soggetti particolari (con insufficienza renale, anziani oppure con insufficienza epatica). L'obiettivo generale della fase II è quello di confermare l'efficacia terapeutica e la tollerabilità del nuovo farmaco in patologie specifiche rappresentanti le probabili indicazioni elettive ipotizzate nel progetto di sviluppo clinico [25]. Solo quando i risultati della fase II confermano le ipotesi sull'efficacia e tollerabilità del nuovo farmaco si decide di passare alla fase successiva cioè nella fase III dello studio clinico.

c) fase III: Nella fase III vengono eseguiti studi di controllo (comparativi) su caratteristiche ancora più ampie per confermare l'efficacia terapeutica e definire ancor meglio la tollerabilità del nuovo farmaco. Altri obiettivi di questa fase sono una completa definizione di controindicazioni e delle possibili alterazioni con altri farmaci in trattamenti concomitanti. Gli studi comparativi si eseguono in condizioni di doppia cecità, cioè quando lo sperimentatore e il paziente non conoscono l'identità del trattamento somministrato / assunto. Se i risultati della fase III sono attendibili e dimostrativi dell'efficacia terapeutica e della tollerabilità anche rispetto al farmaco di confronto per cui il nuovo farmaco dimostra di essere una favorevole alternativa terapeutica, si avvia la procedura della presentazione della documentazione all'Autorità sanitaria per richiedere l'AIC e per stabilire il prezzo del nuovo medicinale. A conclusione dell'istruttoria amministrativa viene concessa l'autorizzazione e il nuovo farmaco può essere commercializzato.

d) fase IV: Mentre si attende l'ottenimento dell'AIC i studi clinici in corso proseguono, si potrebbe parlare di un'ulteriore fase III di transizione. A conclusione dell'istruttoria amministrativa viene concessa l'autorizzazione e il nuovo farmaco può essere commercializzato [26]. Gli obiettivi principali della fase IV sono di verificare attività e soprattutto la tollerabilità del nuovo farmaco su campioni di maggiori dimensioni e corrispondenti alla reale popolazione dei pazienti, di determinare l'effettività del farmaco in confronto alla efficacia, di identificare le reazioni avverse rare mediante una accurata farmacovigilanza. Tutti gli studi clinici sperimentali dei medicinali nell'uomo devono essere condotti rispettando con la massima esattezza i principi della buona pratica clinica (good clinical practice-GCP) e uno standard

internazionale di etica e di qualità scientifica per la ricerca e sviluppo di studi clinici che coinvolgono soggetti umani (27).

Capitolo 2. Phage display

2.1 Introduzione

Phage display è una tecnica di laboratorio creata da G. Smith nel 1985 come metodo che consente la presentazione di polipeptidi e librerie proteiche sulla superficie del batteriofago (virus che infetta i batteri) filamentoso, che porta alla selezione di peptidi e proteine, anticorpi compresi, con un'elevata affinità e specificità per quasi tutti i tipi di bersagli. Questo metodo attualmente è diventato uno dei metodi più efficaci per produrre grandi quantità di peptidi, proteine e anticorpi. La phage display (esposizione dei fagi) prevede l'introduzione di sequenze peptidiche esogene in una porzione del genoma delle proteine del capsido fagico [28]. I peptidi o le proteine codificati sono visualizzati sulla superficie del fago come un prodotto di fusione con una delle proteine componenti del rivestimento del fago. In quanto possiamo dire che invece di ingegnerizzare geneticamente diversi peptidi o proteine uno alla volta e quindi esprimere, purificare e analizzare ciascuna variante, con questa tecnica, possiamo avere più di mille varianti delle librerie di visualizzazione dei fagi costruite contemporaneamente. Le particelle di fagi sono particolarmente resistenti alle condizioni difficili come basse temperature o pH bassi (acide) e di conseguenza non perdono l'affinità batterica. Protocolli che utilizzano pH basse e urea in elevate concentrazioni sono stati usati per la dissociazione del fago da un bersaglio. Non si effettua l'eluizione per il fago legato a un bersaglio prima dell'infezione batterica. Inoltre, l'infezione può continuare dopo l'aggiunta di batteri direttamente nel pozzo, nell'organo o tessuto omogenizzato. La capacità di identificare regioni interattive di proteine o altre molecole senza nozioni già esistenti sulla natura dell'interazione, è il punto potente di questa tecnica che ha avuto una grande influenza e successo sulle scoperte fatte nei campi dell'immunologia, della biologia cellulare, e soprattutto nel mondo della farmacologia e scoperta di farmaci. L'ultimo decennio ha avuto notevoli progressi nell'applicazione di phage display, diverse piattaforme di screening hanno consentito l'isolamento e la caratterizzazione di peptidi che si legano a diverse molecole in vitro, nel contesto di cellule viventi, negli animali e nell'uomo

[29]. Nell'anno 2018 G. Smith e Winter vengono premiati con il premio Nobel per la chimica, per avere fondato la tecnica phage display utilizzata per produrre peptidi e anticorpi.

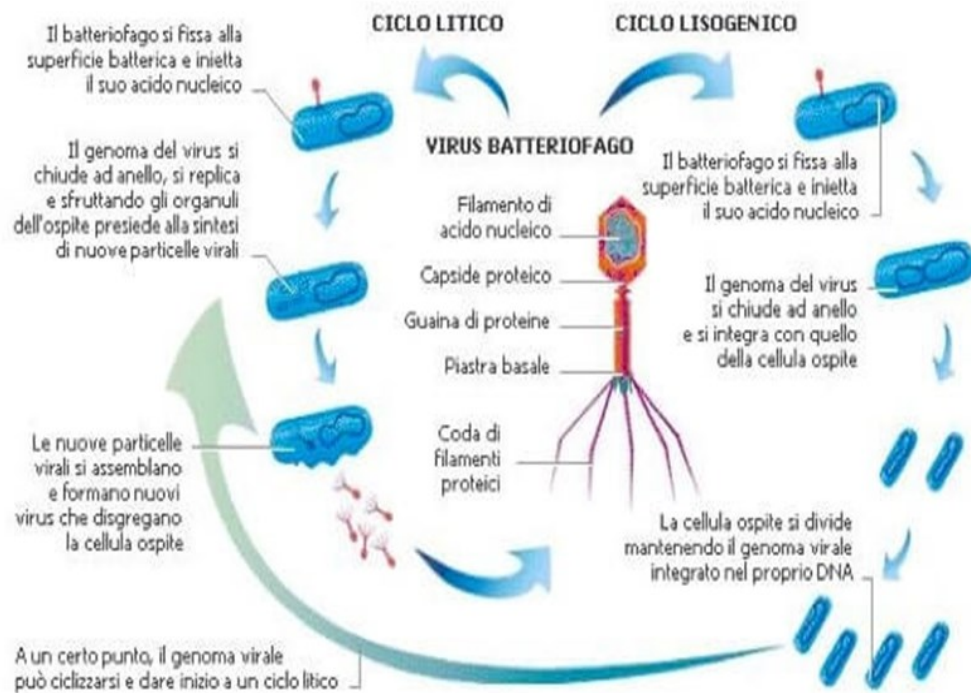
2.2 Batteriofagi, virus procariotici

I Batteriofagi, comunemente chiamati fagi sono dei virus che infettano le cellule batteriche. Sfruttano il loro apparato biosintetico per effettuare la replicazione virale, provocando così la loro morte per lisi. La struttura di questi virus consiste in un filamento di materiale genetico DNA oppure raramente di RNA, avvolto da un rivestimento di proteine chiamato capsid. Il genoma delle particelle fagiche ha un numero limitato di geni, particolarmente di geni utili nella replicazione. I batteriofagi come tutti i virus sfruttano le strutture dell'ospite per il loro ciclo vitale. Il processo dell'infezione virale avviene attraverso tre fasi:

- il fago attacca il batterio all'esterno e inietta il suo cromosoma di DNA nell'ospite
- la molecola del DNA del fago viene replicata, di solito da enzimi specifici codificati da geni presenti sul cromosoma del fago
- gli altri geni del fago dirigono la sintesi dei componenti dell rivestimento proteico

I batteriofagi vengono divisi in due grandi categorie, batteriofagi testa-coda e batteriofagi filamentosi.

Batteriofagi testa-coda: Questi fagi hanno una struttura molto complessa, che consiste in una testa chiamata capsid che solitamente ha una forma icosaedrica e contiene un cromosoma a doppio filamento. Alla testa si allega una struttura filamentosa chiamata coda, costituita da proteine specifiche. La parte finale della coda contiene delle fimbrie che sono delle strutture proteiche, attraverso le quali il fago prende contatto con il batterio. I fagi testa-coda presentano due tipi di ciclo vitale, il ciclo litico e il ciclo lisogeno ([figura 1](#)).



▼ Figura 1 Ciclo litico e lisogeno di un virus [30]

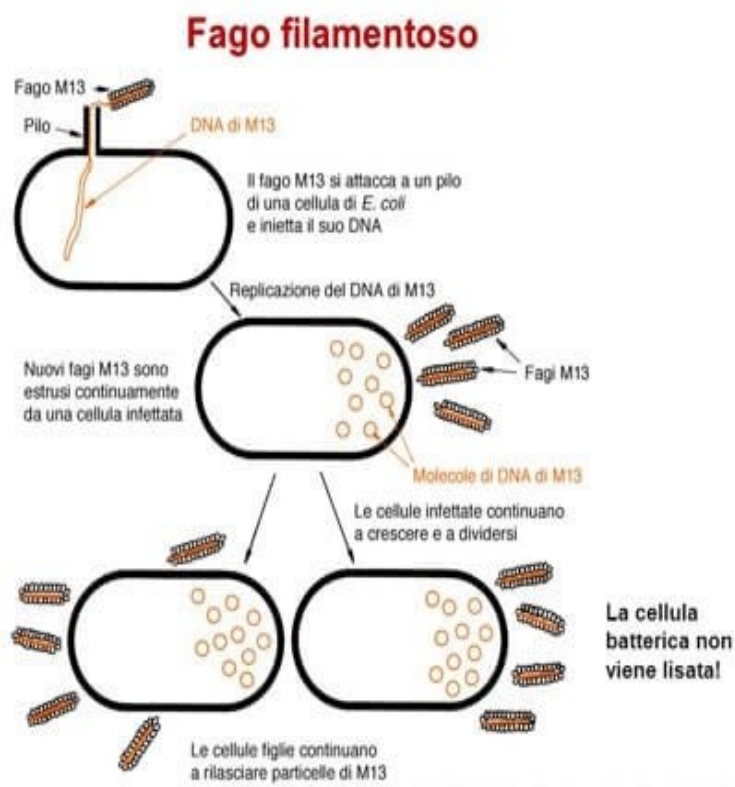
<https://www.chimica-online.it/biologia/immagini/cicli-vitali-fagi-testa-coda.jpg>

- Il ciclo litico: Durante la fase precoce del ciclo litico la RNA polimerasi batterica riconosce come propria una sequenza del DNA virale e inizia la trascrizione dello stesso. Le prime proteine prodotte sono in grado di bloccare la trascrizione del DNA batterico e stimolare la duplicazione del DNA virale. Nella fase tardiva la cellula lavora solo in funzione del virus e sono trascritti i geni virali codificanti per le proteine del capsido e gli enzimi in grado di lisare la cellula ospite [figura 1]. La ricerca avanzata sta sperimentando l'uso di fagi per curare infezioni batteriche poiché sono in grado di instaurare un legame altamente specifico con il batterio patogeno; inoltre, i fagi si evolvono insieme ai batteri e sarà dunque improbabile ottenere una popolazione batterica resistente ai fagi, come invece sta avvenendo per molti antibiotici di sintesi. Per contro, l'alta specificità diventa un evidente ostacolo nella cura, poiché l'identificazione dell'esatto ceppo batterico richiede tempi che potrebbero essere fatali [31]. Nel ciclo litico, dopo l'infezione virale

avviene l'immediata produzione di molte unità virali provocando così la lisi della cellula batterica.

-ciclo lisogeno: In questa situazione il virus è inattivo e viene chiamato profago. La cellula batterica per il momento non viene distrutta e il virus sfrutta la riproduzione batterica per ottenere un "passaggio gratuito" infettando in tal modo un certo numero di cellule. In particolari condizioni di stress della cellula ospite, il profago si stacca dal cromosoma batterico e inizia a riprodursi, passando al ciclo litico [figura 1]. I batteri che ospitano questo tipo di riproduzione sono chiamati batteri lisogeni e i virus sono definiti temperati. L'organismo modello che ha permesso di approfondire questi e altri studi relativi agli eucarioti è il batteriofago lambda (fago λ), un fago che infetta il batterio *Escherichia coli* presente nel nostro intestino [32].

Batteriofagi filamentosi (vedi figura 2): Nei fagi filamentosi la molecola del DNA genomico è circolare e a singolo filamento, questa molecola viene circondata da una struttura semplice costituita da copie multiple di tre proteine. In genere queste particelle fagiche non hanno la capacità di integrare il proprio genoma con quello batterico ma sono però in grado di infettare la cellula batterica senza provocare la loro lisi. Un fago filamentoso entra nella cellula batterica attraverso il pilus (struttura che permette la connessione tra due cellule batteriche durante la coniugazione sessuale), lasciando fuori il suo involucro proteico. Essendo a singolo filamento funge da stampo per la sintesi di un filamento complementare, portando alla formazione di un DNA a doppio filamento, che è la forma replicativa (figura 2). I batteriofagi trovano impiego nelle tecnologie del DNA ricombinante, e nella tecnologia di visualizzazione dei fagi, insieme ai plasmidi come vettori di clonaggio. I fagi usati sono il fago λ (lambda) che è un fago testa-coda, e il fago M13 che è un fago filamentoso.

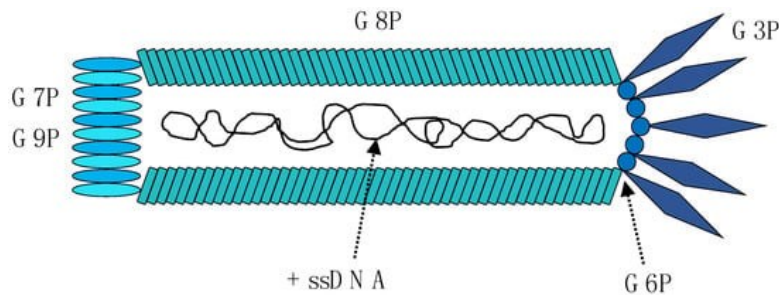


▼ **Figura 2** l'infezione virale del fago filamentoso [33] <https://www.chimica-online.it/biologia/immagini/cicli-vitali-fagi-testa-coda.jpg>

2.3 Batteriofago M13

Nella tecnica della visualizzazione dei fagi possono essere usati diversi sistemi batteriofagici filamentosi, tra cui il fago lambda, f1, fd, ma l'elemento centrale di questa tecnologia è l'utilizzo del batteriofago M13. Questi fagi sono tutti filamentosi, non litici e sono in grado di incorporare DNA a singolo filamento, ma quello che differenzia il M13 dagli altri è che questo fago può essere facilmente purificato. Il genoma di questo fago è dotato di un cromosoma a DNA a singolo filamento, ed è maschio-specifico perché penetra nella cellula ospite attraverso i pilus. L'M13 viene diversamente indicato come Ff. I fagi Ff infettano solo ceppi di *Escherichia Coli* che esprimono il pilus F, l'adsorbimento del fago all'interno del

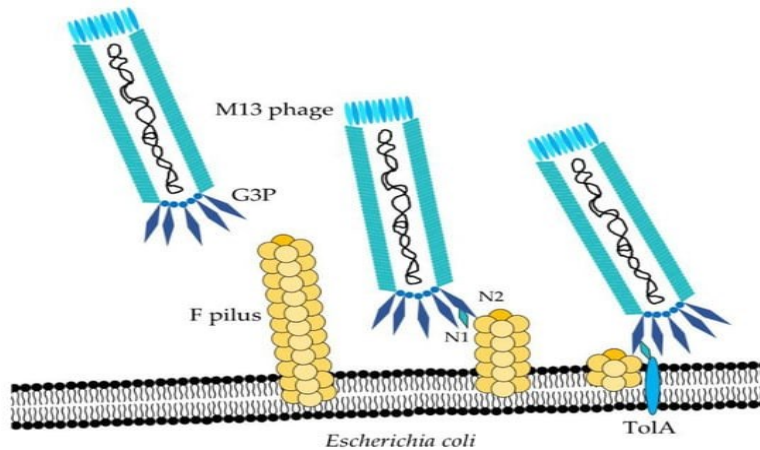
batterio richiede un legame tra una proteina appratente al mantello del fago, e la punta del pilus F esposto dall'ospite. Il fago M13 stabilisce una infezione in via lisogena nel suo ospite e non e considerato né un fago temperato e né un fago litico, appunto perché non provoca la lisi ma produzione delle particelle fagiche. Il genoma di DNA a singolo filamento ha una lunghezza di 6407 bp che consiste in nove geni che possono codificare 11 diverse proteine. Da queste 11 proteine, 5 fanno parte del matello, e le altre sono coinvolte nel processo della replicazione e nell'assemblaggio del fago. Le proteine del mantello sono le seguenti, G3P, G6P, G7P, G8P, G9P quella più abbondante e la proteina G8P e forma un involucro attorno al cromosoma (figura 3).



▼ Figura 3. Rappresentazione schematica del batteriofago M13 [34]

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6024766/>

L'infezione da parte di un M13 inizia con il processo di adsorbimento, che avviene attraverso il legame del dominio N2 della proteina di rivestimento G3P, con la punta del pilus F, che si trova sulla superficie dell'ospite. Quando il fago si lega alla punta del pilus F, viene automaticamente avvicinato alla superficie del batterio per disassemblaggio. Nel Escherichia Coli sono presenti tre proteine Tol, le quali TolA, TolR, TolQ, tutte sono essenziali per il processo di infezione mediato dalla depolarizzazione del capsido fagica, e la trascrizione del DNA a singolo filamento nell'ospite. Il legame tra dominio N2 della G3P con il pilus F media l'allocatione del dominio N1 della proteina G3P e gli consente di legare la proteina TolA presente nel batterio, questa proteina funge da co-recettore sulla superficie del batterio (figura 4).

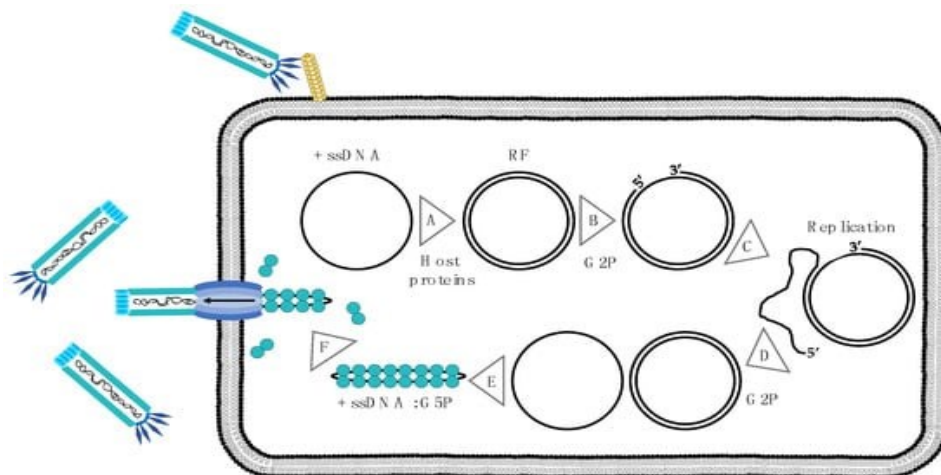


▼ Figura 4. Infezione di Escherichia Coli da parte del fago M13 [35]

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6024766>

-ciclo di infezione del fago M13: Come è stato illustrato nella (figura 5), (A) al momento dell'infezione il cromosoma a singolo filamento (+) del fago M13 si converte nella forma replicata a doppio filamento (RF). (B) Dopo un accumulo di adeguato la proteina G2P intacca il filamento nella RF e si lega con legame covalente alle estremità 5' [36]. (C) Il genoma viene replicato dall'estremità 3' dell'intaccatura, utilizzando come il filamento (-) come modello. Il filamento (+) originale legato a G2P viene fisicamente spostato dall'elicasi rep durante il processo di allungamento [37]. (D) Il vecchio filamento (+) viene ricircolato dalle G2P legate dopo la dissociazione, pronto per essere convertito in una RF o per essere impacchettato in nuovi fagi M13, la replicazione del genoma continua fino a quando la concentrazione di G5P si accumula a livelli sufficienti per sequestrare l'ssDNA [38]. (E) Quando si accumula una quantità sufficiente di G5P, le G5P legano l'ssDNA in una conformazione dimerica back-to back, causando l'aspetto, a forma di bastoncino dell'ssDNA [39]. (F) Si forma un poro nella membrana e il genoma del fago viene traslocato attraverso questo poro mentre il mantello del fago viene assemblato [40]. L'assemblaggio e la gemmazione del fago M13 è un processo che comprende cinque fasi, le quali sono, preinfezione, infezione, allungamento, preterminazione e in fine la terminazione. Durante la fase di preinfezione si forma un complesso di assemblaggio, questo assemblaggio è composto dalle proteine G1P, G11P e G4P, che interagiscono attraverso i loro domini periplasmatici.

L'iniziazione attende la formazione del complesso di assemblaggio durante la preinfezione e l'accumulo di cromosomi M13 legati a G5P, e successivamente posiziona G7P e G9P all'estremità del complesso [41]. Qui, G7P e G9P interagiscono con il segnale di impacchettamento nel cromosoma del fago, che facilita il contatto con G1P, con conseguente legame della tioredossina della cellula [42]. Durante la fase di allungamento il G5P legato al genoma del fago viene sostituito dal G8P per la traslocazione del DNA attraverso il canale di membrana [43]. La traslocazione continua fino a quando il genoma del fago è completamente rivestito di G8P, altri genomi fagici possono essere caricati attraverso il poro, con la conseguente formazione di una particella fagica molto più lunga [44]. Nella fase di preterminazione, le G3P incorporate nella membrana e complessate con le G6P, sono incorporate all'estremità terminale della particella fagica, in fine la fase di terminazione comporta il rilascio del fago.



▼ Figura 5. Ciclo di infezione del fago M13 [45]

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6024766/>

2.4 Vettori e librerie di phage display

I fagi sono virus che infettano i batteri, molti dei vettori utilizzati nella ricerca del DNA ricombinante sono fagi che infettano l'ospite standard del DNA ricombinante i batteri Escherichia Coli [46]. La caratteristica fondamentale dei vettori di DNA

ricombinante, compresi i fagi, è che accolgono segmenti di DNA “estraneo”, frammenti di DNA umano o anche tratti di DNA sintetizzato chimicamente [47]. Quando il DNA del vettore si replica sul batterio E. Coli, l’inserto estraneo si replica insieme ad esso come una sorta di passeggero [48]. Nel vettore di visualizzazione dei fagi il DNA estraneo viene espresso come una proteina, questa e una caratteristica in più che hanno questi vettori rispetto ai vettori in generale. Cioè un vettore di visualizzazione dei fagi programma il macchinario della cellula ospite per sintetizzare un peptide estraneo che ha una sequenza di amminoacidi determinata tramite il codice genetico, dalla sequenza nucleotidica dell’inserto. La visualizzazione dei fagi differisce dai sistemi di espressione convenzionali, tuttavia, in quanto la sequenza del gene estraneo è giuntata al gene per una delle proteine del rivestimento del fago, in modo che la sequenza dell’amminoacido estraneo sia geneticamente fusa con gli amminoacidi endogeni della proteina del rivestimento per creare una proteina ibrida di “fusione” [49]. La proteina di rivestimento ibrida viene incorporata nelle particelle fagiche (“virioni”) mentre vengono rilasciate dalla cellula, in modo che il peptide estraneo o il dominio proteico vengano visualizzati sulla superficie [50].

Una “libreria” di phage display e una miscela eterogenea di tali cloni di fagi, ciascuno di questi cloni porta un diverso inserto di DNA estraneo e di conseguenza mostra un diverso peptide sulla sua superficie. Ogni peptide nella libreria può replicarsi, poiché quando il fago a cui è attaccato infetta una cellula ospite batterica fresca, si moltiplica per produrre un enorme raccolto di fagi di progenie identici che mostrano lo stesso peptide [51]. E se il DNA del fago subisce una mutazione nella sequenza codificante del peptide, tale mutazione viene trasmessa alla progenie del fago e può influenzare la struttura del peptide [52]. Due sono le caratteristiche chiave per l’evoluzione chimica, dei peptidi di una libreria di phage display, la replicazione e la mutabilità. Un peptide esposto a causa della sua accessibilità al solvente spesso si comporta come farebbe come se non fosse stato attaccato alla superficie del virione. Ad esempio, i peptidi ligandi per i recettori mantengono la loro affinità e specificità quando vengono visualizzati sulla superficie del virione. Questo significa che la purificazione per affinità in cui un recettore immobilizzato viene utilizzato per “catturare” in modo specifico ligandi da una complessa miscela di composti, può essere ugualmente utilizzata per catturare i fagi che mostrano il

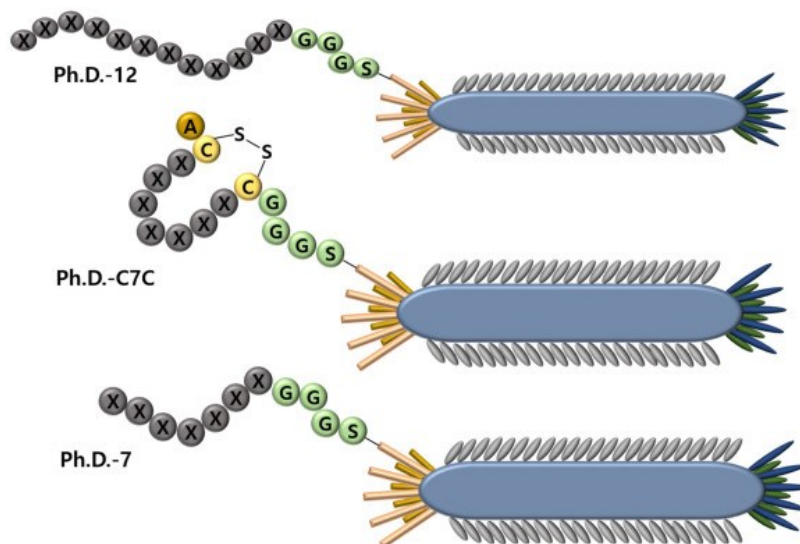
recettore-peptidi leganti da una grande libreria di fagi che mostrano molte diverse strutture peptidiche [53]. I fagi catturati vengono “amplificati” infettandoli *in mass* in cellule fresche e coltivando le cellule per produrre un grande raccolto di fagi di progenie, che possono servire come input per un altro ciclo di purificazione dell’affinità [54]. Inoltre, introducendo periodicamente mutazioni nella popolazione dei fagi, lo sperimentatore amplia la ricerca di ligandi efficaci esplorando sequenze peptidiche non presenti nella libreria di visualizzazione dei fagi iniziale [55]. Alla fine, i fagi catturati vengono clonati in modo che i peptidi visualizzati responsabili del legame possano essere studiati individualmente [56]. La sequenza amminoacidica del peptide si ottiene facilmente determinando la sequenza codificante corrispondente nel DNA virale. Questa cosiddetta “selezione di affinità” è il principale esempio di selezione artificiale imposta alle popolazioni di peptidi mostrati dai fagi [57].

2.5 Librerie di fagi M13

La costruzione della libreria fagica richiede la tecnologia di ricombinazione genica per inserire peptidi estranei o frammenti proteici nel genoma della proteina del rivestimento fagico per realizzarne la trascrizione e la traduzione [58]. Questi batteriofagi ricombinanti sono generalmente batteriofagi filamentosi come il batteriofago M13 sopra descritto [59]. Per la forma di visualizzazione, principalmente si usano vettori fagici e sistemi fagemidi. Tutte le copie di proteine di rivestimento sui vettori fagici sono state fuse con peptidi estranei o frammenti proteici [60]. Frammenti proteici più grandi possono influenzare l’infezione dei vettori fagici a *E. Coli F pilus*, ed è questo il motivo per il quale i vettori fagici solitamente si usano per costruire brevi librerie di peptidi. Nel sistema fagemidico, il gene della proteina di rivestimento e il gene estraneo vengono fusi insieme per poi integrarsi nel genoma di un fago contenente solo le origini di replicazione della regione intergenica del plasmide e del fago. Per aiutare i fagemidi a infettare l’ospite e fornire proteine importanti sono necessari i fagi helper. I fagemidi sono vettori più efficaci nella trasformazione, sono geneticamente più stabili dei fagi

ricombinanti in tante propagazioni. La visualizzazione sul sistema fagemide e monovalente. Diverse librerie di fagi/fagimide per antigeni specifici possono essere costruite in base alle dimensioni del peptide, dell'epitopo o dell'anticorpo visualizzato nonché della natura dell'antigene e del tipo di vettore fagico [61]. I sistemi di fagemide sono più in grado di costruire una libreria di grande capacità, questo per il motivo delle dimensioni ridotte e della facile clonazione. La costruzione di una libreria di peptidi di affinità fornisce la base per lo screening di peptidi di affinità per obiettivi specifici [62]. Rispetto alla libreria del sistema fagemidico, la libreria del vettore fagico accorcia e semplifica la selezione dell'affinità [63].

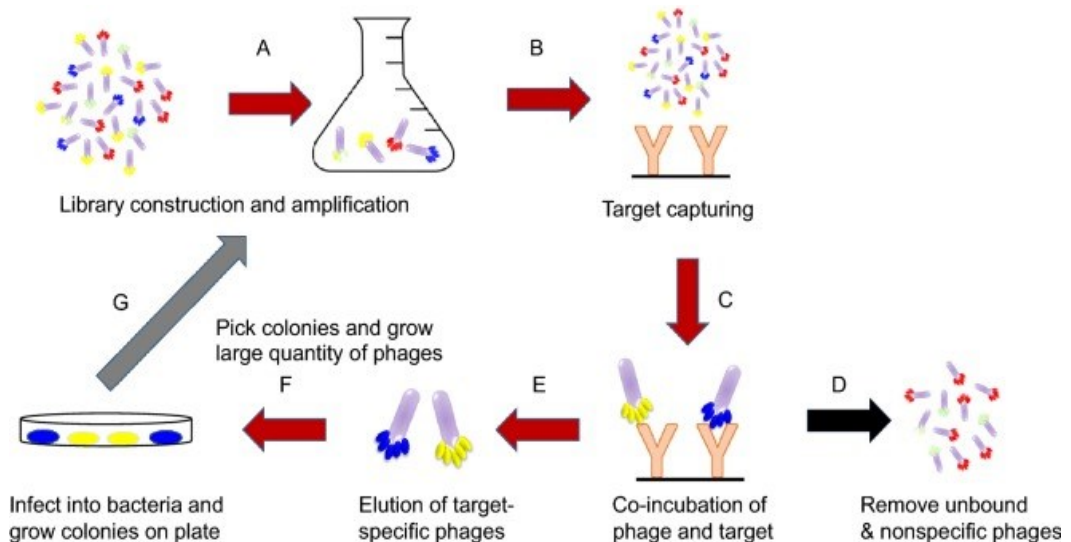
Eccetto librerie fatte in casa, librerie di peptidi casuali commerciali e vettori commerciali sono disponibili per accelerare il lavoro dei ricercatori scientifici [64]. In base alla lunghezza e al tipo, esistono tre diverse librerie di fagi peptidici display prodotte commercialmente: libreria di eptapeptidi con vincoli di loop (Ph.D.-C7C), libreria di eptapeptidi lineari (Ph.D.-7) e libreria di dodecapeptidi lineari (Ph.D.-12), come mostrato in (figura 6) [65]. Sulla base delle librerie commerciali, una certa abbondanza di librerie fagiche può essere ottenuta mediante modificazione chimica senza ricombinazione genetica [66].



▼ **Figura 6** Rappresentazione pittorica di una libreria di visualizzazione di batteriofagi M13 [67]

2.6 Il metodo di selezione dei fagi

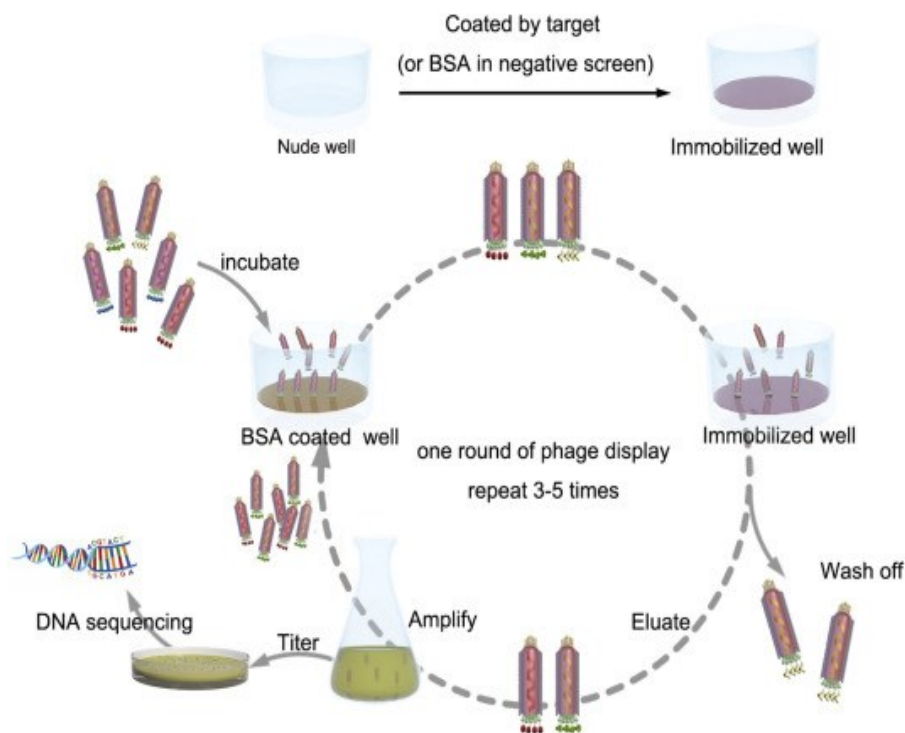
Il metodo di selezione dei fagi viene denominato biopanning, e un processo di selezione per affinità che isola le molecole che legano il bersaglio. Come spiegato in figura (figura 7) il biopanning è un processo che consiste in cinque fasi di screening per la selezione dei peptidi. Il primo passaggio è la costruzione e l'amplificazione di librerie, dove le librerie vengono costruite tramite la clonazione della sequenza di DNA combinatoria. Una volta costruita la libreria verrà amplificata prima del biopanning. Il secondo passaggio è la "fase di cattura del bersaglio" fase dove la libreria dei fagi viene incubata con la molecola bersaglio per un determinato tempo che consente il legame. Il terzo passaggio consiste nel "rimuovere i fagi non legati e non specifici", questo processo viene effettuato utilizzando lavaggi ripetitivi per rimuovere eventuali fagi non legati e non target specifici. Il quarto passaggio è la "fase di eluizione" fase dove vengono separati i fagi legati al target, dopo una breve incubazione con tampone a basso pH oppure mediante eluizione competitiva. Il quinto passaggio e consiste nella parte finale è la fase di "stadio di infezione" dove i fagi eluiti vengono infettati nei batteri per amplificare i fagi selezionati, creando così una nuova libreria di fagi più selettiva, che dovrebbe essere poi applicata in un successivo ciclo di biopanning.



▼ **Figura 7.** Lo schema generale della tecnica di visualizzazione dei fagi e la selezione del biopanning del peptide ad alta affinità [68]
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6834755/bin/13238_2019_639_Fig2_HTML.jpg

Generalmente è necessario ripetere il ciclo di biopanning da tre a cinque volte, per poter isolare leganti peptidici specifici ad alta affinità. I fagi non specifici vengono rimossi e i fagi con alta affinità per il bersaglio vengono isolati aumentando la rigidità in ogni ciclo di biopanning, aumentando il numero di lavaggi e diminuendo la quantità di molecola bersaglio [69]. Alla fine del biopanning, l'ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) dei fagi e il sequenziamento del DNA vengono utilizzati per l'identificazione del fago individualmente specifico con un'elevata affinità al bersaglio [70].

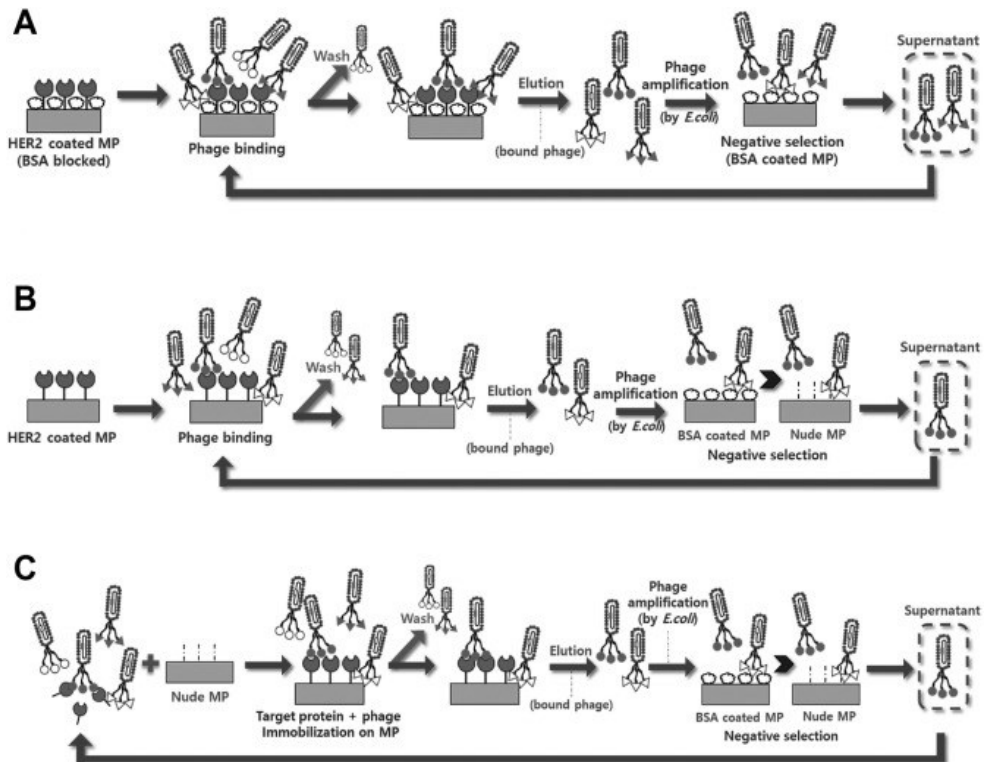
2.7 Strategia di base del biopanning:



▼ **Figura 8** Schema della strategia di bio-panning di base tramite piastre a pozzetti. Un pozzetto rivestito di albumina di siero bovino (può essere modificato di conseguenza) viene solitamente impostato come controllo negativo, ma può essere sostituito da un pozzetto nudo. Ogni ciclo di procedure di bio-panning include incubazione, lavaggio, eluizione, amplificazione e titolazione. Dopo aver completato da 3 a 5 round, sarà richiesto il sequenziamento del DNA del fago selezionato. [71] <https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0165993621000510-gr2.jpg>

In [figura 8](#) è stata dimostrata la schematizzazione di un generale biopanning. In primo luogo, un'immobilizzazione sulla micropiastra verrebbe preparata rivestendo con il bersaglio e bloccata mediante tampone bloccante. Dopo il lavaggio, le piastre vengono incubate con la libreria fagica casuale con una certa risatina a temperatura ambiente [72]. Successivamente, i fagi non legati vengono eliminati mediante lavaggio e i fagi legati vengono eluiti aggiungendo tampone di eluizione [73]. I fagi raccolti entrano nell'amplificazione al ciclo successivo di bio-screening come una nuova "biblioteca" [74]. Il dosaggio e il tempo di incubazione di tutti i tamponi possono essere regolati in base al contesto dell'esperimento [75].

Il metodo di micropiastra è un metodo semplice ed efficiente per il biopanning del peptide di affinità. Le proteine bersaglio possono essere immobilizzate sulle micropiastre dell'immunoma tramite modifica della biotina o dell'avidina [76]. Un giro di panning *tramite* una micropiastra può essere completato in 3 giorni, ma il metodo con piastra a pozzetti non è adatto per target come gli ioni metallici che non possono essere rivestiti sul pozzetto [77]. Per migliorare i disavanzi, le fasi di screening positivo e screening negativo si possono impostare per ridurre l'adsorbimento di peptidi con bassa specificità. È stata proposta una strategia di coincubazione della libreria fagica e del bersaglio per migliorare il tasso di acquisizione dei peptidi altamente specifici [78]. I fagi vengono legati in anticipo alla superficie del bersaglio così si evitano legami non specifici. Per confrontare i metodi di screening biologici convenzionali, si usa il dominio extracellulare HER2 (recettore due per il fattore di crescita epidermico umano) ([vedi fig.9 A](#)) e i seguenti due metodi di screening modificati.



▼ **Figura 9** Schema di tre metodi di bio-panning che utilizzano HER2 come modello. (A) Bio-panning di base; (B) metodo di biopanning modificato 1; (C) metodo di biopanning modificato 2; fago positivo (●), fago non legante (○) e fago legante non specifico (△, ▲) [79] <https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0165993621000510-gr2.jpg>

Metodo 1: aggiunta di panning negativo di piastre a pozzetto nudo (vedi fig.9 B)

Metodo 2: pre-legame di fago e bersaglio (vedi fig.9 C).

I risultati del test hanno mostrato che il metodo due si presta in maniera migliore. Complessivamente, l'80% dei peptidi che si sono sottoposti a screening con entrambi i metodi hanno presentato un'affinità maggiore rispetto al fago di tipo selvaggio.

2.7 Screening di phage display

Gli screening utilizzati nella ricerca per isolare il peptide ad alta affinità sono di quattro tipi: screening in situ, in vitro, in vivo, ex vivo.

Screening in situ: lo screening omogeneo in situ della visualizzazione dei fagi richiede solo il rivestimento del target specifico su un 96 pozzetti. Un'esposizione a target singolo garantisce l'isolamento del peptide target-specifico, senza interferenze esterne dovute al legame non specifico [80]. Questo metodo è il metodo più semplice perché tutti gli esperimenti potrebbero essere effettuati senza un sistema vivente (es modelli animali, colture cellulari, campioni di pazienti). Lo screening in situ presenta degli svantaggi come il rischio di legame non specifico del peptide isolato quando è esposto in un sistema in vitro o in vivo. Inoltre, essendo il bersaglio rivestito artificialmente sulla piastra, potrebbe rappresentare in modo errato l'effettiva struttura secondaria del bersaglio in un sistema vivente, di conseguenza aumenta il rischio di isolare un peptide che si lega solo al recettore.

Screening cellulare in vitro: Questo metodo offre un approccio per identificare più peptidi che si legano specificamente a una singola cellula e possono essere effettuati su cellule aderenti (vive o fisse). I vantaggi di questo metodo sarebbero che le cellule mantengono le loro funzioni e attività biologiche, il corretto ripiegamento, la struttura tridimensionale, il livello di espressione del recettore e la loro associazione con le proteine vicine. È importante sottolineare che il biopanning cellulare *in vitro* potrebbe identificare nuovi recettori della superficie cellulare con funzioni biologiche sconosciute, che potrebbero essere utilizzati per fornire informazioni su specifici cambiamenti molecolari [81].

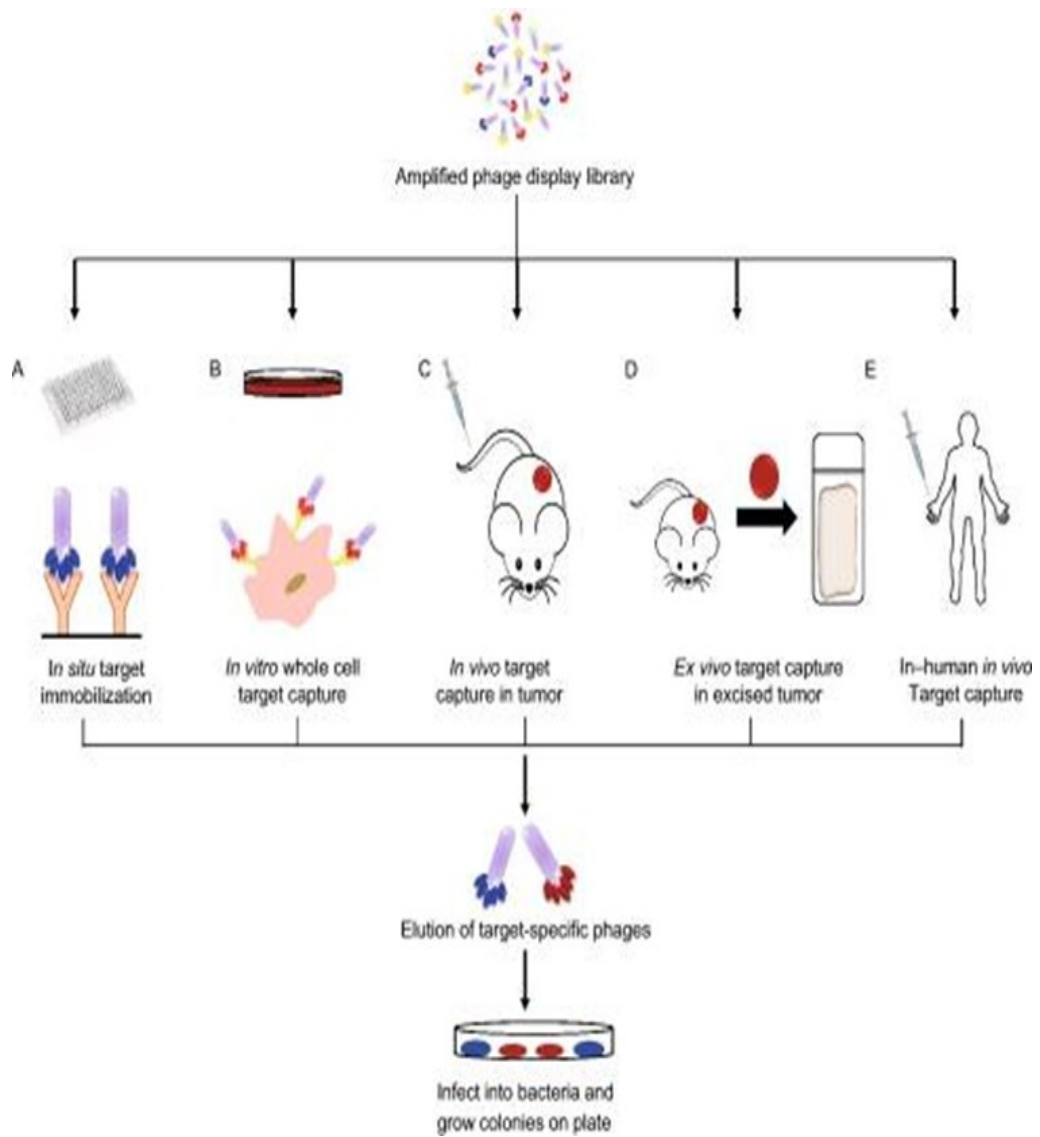
Screening in vivo: Quando il biopanning e la selezione viene eseguita in un animale, è possibile isolare peptidi organo-specifici. La tecnologia di phage display in vivo è stata descritta per la prima volta da Roushlati e i suoi colleghi nel 1996. Per il protocollo di biopanning *in vivo*, la selezione del biopanning è simile a quella dello screening *in vitro*, con la differenza che la libreria di fagi peptidici è stata introdotta nell'animale tramite iniezione endovenosa sistemica e ha permesso che si

verificasse il legame entro 1–2 h, dopo di che gli animali verranno perfusi per rimuovere i fagi non legati, sacrificati e gli organi desiderati verranno raccolti e omogeneizzati. Il fago tessuto-specifico dovrebbe aumentare dopo 3-5 cicli di biopanning [82].

Screening ex vivo: Metodo pubblicato per la prima volta su Nature (rivista scientifica) nel 2001. È un metodo che dovrebbe essere applicato solo alla selezione di una specifica cellula rara in una popolazione eterogenea. Lo svantaggio di questo metodo è che è ottimizzato solo per la selezione del ligando a base di anticorpi e quindi non adatto per la selezione del peptide.

Screening umano: Per diminuire la compatibilità della differenza di specie tra dapi e umani è stato segnalato che il phage display è stato sottoposto a screening su pazienti umani [83]. Il primo screening per la visualizzazione dei fagi nell'uomo è stato segnalato da Arap e colleghi nel 2002. Hanno riportato un eptapeptide SMSIARL che potrebbe ospitare specificamente la vascolarizzazione della prostata e ha mostrato una specificità 10-15 volte maggiore per la prostata rispetto ad altri organi [84].

Anche se lo screening in situ della visualizzazione dei fagi, e in grado di generare peptidi ad alta affinità e specificità, per riuscire ad imitare meglio le condizioni cellulari e corporee, nel mondo della ricerca si conducono ricerche di screening in vitro, in vivo e anche in ex vivo. Come è stato espresso anche nella [\(figura 10\)](#) si effettua lo screening anche direttamente su pazienti in cura.



▼ **Figura 10** Vari approcci nella cattura del peptide ad alta affinità attraverso lo screening della visualizzazione di fagi [85]

https://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6834755/bin/13238_2019_639_Fig2_HTML.jpg

Capitolo3: Applicazioni di phage display nel campo farmaceutico

3.1 Introduzione

La visualizzazione di peptidi e proteine sulla superficie dei batteriofagi rappresenta una nuova potente metodologia per realizzare l'evoluzione molecolare in laboratorio [86]. La capacità di costruire librerie di enormi diversità molecolari e di selezione molecolare con proprietà predeterminante ha reso questa tecnologia applicabile in un'ampia gamma di problemi [87]. Nel giro di pochi anni dagli esperimenti di George Smith sono state assemblate le prime librerie di peptidi casuali visualizzati dai fagi (Cwirla et al. 1990; Devlin et al 1990; Scott e Smith 1990), accompagnate dalla segnalazione che anche le proteine correttamente ripiegate e funzionali potevano essere visualizzate sulla superficie di M13 (Bass et al. 1990; McCafferty et al 1990) [88]. Uno degli aspetti più impressionanti della phage display e la varietà di usi di questa tecnologia [89]. Di seguito sono elencate e discusse alcune delle numerose applicazioni.

Visualizzazione faagica di peptidi naturali

- a) Mappatura degli epitopi e di anticorpi monoclonali e policlonali
- b) Generazione di immunogeni

Visualizzazione faagica di peptidi casuali

- a) Mappatura degli epitopi e anticorpi monoclonali e policlonali
- b) Identificazione dei ligandi peptidici
- c) Mappatura dei siti di substrato per proteasi e chinasi

Visualizzazione faagica di proteine e domini proteici

- a) Evoluzione diretta delle proteine
- b) Isolamento di anticorpi ad alta affinità

c) Screening dell'espressione de cDNA [90].

3.2 Visualizzazione fagica di peptidi naturali

- **Mappatura degli epitopi di anticorpi monoclonali e policlonali:** Una delle motivazioni alla base degli esperimenti originali effettuati negli anni 1985 da George Smith era quella di utilizzare la phage display come mezzo per l'identificazione dei cloni che esprimevano epitopi che vengono riconosciuti da un determinato anticorpo. La mappatura degli epitopi degli antigeni proteici è stata basata tradizionalmente sull'analisi chimico-fisica. Questi approcci hanno incluso: 1-frammentazione dell'antigene purificato (proteina) con varie proteasi, identificazione dei frammenti reattivi e le loro sequenziamento; 2- esperimenti di identificazione chimica in cui i residui che interagiscono con l'anticorpo sono protetti dalla modificazione; 3- sintesi di una serie di peptidi corrispondenti alla struttura primaria dell'antigene; e 4- caratterizzazione fisica diretta mediante NMR o cristallografia a raggi-X [91]. Tutti questi metodi richiedono molto lavoro per essere eseguite e generalmente non sono adatte ad un'analisi che abbia un alto rendimento. In alternativa a questi metodi, si potrebbe effettuare la visualizzazione fagica per localizzare l'epitopo antigenico in tempi relativamente brevi. Frammenti di DNA che codificano porzioni dell'antigene proteico sono fusi con il gene che codifica la proteina pIII del capsido del fago. I fagi possono essere testati con l'anticorpo per determinare quali frammenti visualizzati reagiscono con l'anticorpo [92]. Questo è stato fatto nel 1991 da Tsunetsugu-Yokota et al., con molto successo per il gene gag dell'HIV, e poi per la proteina del capsido VP5 del virus della febbre catarrale dei bovini, da L-F. Wang et al., nel 1995. Ciascun antigene rappresenta la costruzione di una nuova libreria fagica anche se di dimensioni ridotte, rispetto alla maggior parte delle librerie di peptidi casuali, questo fa sì che questo approccio ponga dei limiti. Inoltre, il DNA che codifica l'antigene deve codificare l'epitopo.

- **Generazione di immunogeni:** La phage display può essere utilizzata anche per generare immunogeni. Brevi segmenti di varie proteine sono stati visualizzati sulla superficie del fago M13 allo scopo di produrre anticorpi contro le proteine di rivestimento di alcuni parassiti e virus. Le unità ripetute della proteina del

circumsporozoite del parassita della malaria umana *plasmodium falciparum* sono state visualizzate e hanno portato alla produzione di anticorpi anti circumsporozoite (de la Cruz et al., 1988; Greenwood et al., 1991 [93]. Vari segmenti di diverse proteine di rivestimento del virus dell'immunodeficienza umana (HIV) sono stati visualizzati allo scopo di generare un vaccino (Tsunetsugu-Yokota et al., 1991; Minnenkova et al., 1993; Veronese et al., 1994) [94]. La risposta immunitaria alle particelle virali M13 iniettate è dipendente dalle cellule T e non richiede adiuvanti (Willis et al., 1993) [93]. Pertanto, l'uso di particelle ricombinanti di M13 per la generazione di anticorpi è di grande valore potenziale sia per gli scienziati che per i clinici [95].

3.3 visualizzazione fagica di peptidi casuali

La costruzione di librerie combinatorie di peptidi è stata una delle applicazioni più importanti della tecnica di phage display. Oligonucleotidi sintetici, di lunghezza fissa ma con codoni non specificati, possono essere clonati come fusioni nei geni III o VIII dell'M13, dove vengono espulsi come una pluralità di proteine di fusione peptide-capside [96]. Le librerie chiamate librerie di peptidi casuali possono essere testate per verificare il legame con le molecole bersaglio di interesse. Questo generalmente viene eseguito utilizzando il biopanning che è una forma di selezione di affinità nota. Le librerie di peptidi casuali hanno prodotto con successo peptidi che si legano al sito di combinazione di anticorpi, recettori della superficie cellulare, recettori citosolici, proteine extracellulari e intracellulari, DNA e molti altri e molti altri bersagli [97]. Come già citato in precedenza, le sequenze che codificano per i peptidi casuali vengono fuse con i geni PIII o PIII del capsido. Le sequenze fuse con PIII hanno codificato peptidi di lunghezza variabile da 6 aminoacidi a 38 aminoacidi. La fusione con pVIII sembra più limitata per peptidi costruiti da 6-8 aminoacidi. I peptidi visualizzati hanno una terminazione amminica libera ciò che li rende molto flessibili. Poiché questi peptidi sono molto corti, è improbabile che si ripieghino in strutture secondarie stabili [98].

- **Mappatura degli epitopi di anticorpi monoclonali e policlonali:** Le librerie di peptidi casuali sono state preziose per mappare la specificità delle reti di legame

degli anticorpi [99]. Le librerie di peptidi casuali rappresentano una fonte di sequenza da cui è possibile definire operativamente mappature di epitopi e mimotopi. In basso sono portate delle librerie di peptidi casuali visualizzate da fagi, con queste librerie gli scienziati hanno identificato sequenze peptidiche immunodominanti e mappato siti di accessibili e/o funzionali di numerosi antigeni, alcuni dei quali sono elencati di seguito.

Mappatura di epitopi e mimotopi

Fusioni PIII

mAb A2, M33— myohemerythrin	(Scott and Smith, 1990)
mAb—endorphin	(Cwirla et al., 1990)
mA-HIV gp120	(Christian et al., 1992; Jellis et al., 1993)
mAb B3-carbohydrate	(Hoess et al., 1993)
mAb CB5BIO-PA1-1	(Hoess et al., 1994)
mAb PAB240-p53	(Stephen and Lane, 1992)
pAb goat—mouse Ig	(Kay et al., 1993)
pAb goat—biotin	(Roberts et al., 1993)
mAb 5.5-AchR	(Balass et al., 1993)
mAb DG2, DE6-bFGF	(Yayon et al., 1993)
mAb—keratin	(Bottger and Lane, 1994; Bottger et al., 1995)
mAb AI 6-HSV gpD	(Schellendens et al., 1994)
pAb – TNFa	(Sioud et al., 1994)
mAb SOM-018—	(Wright et al., 1995)

somatostatin

fusioni pVIII

mAb 1B7—pertussin toxin	(Felici et al., 1993)
mAb HI 07—ferritin	(Luzzago et al., 1993)
mAb MGr2-HER2/neu	(Orlandi et al., 1994)
pAb-HbsAg	(Folgori et al., 1994; Motti et al., 1994)

[100]

-Identificazione dei ligandi peptidici: Le librerie di peptidi casuali sono una ricca fonte di ligandi peptidici per una varietà di recettori [101]. In alcuni casi i peptidi assomigliano alla struttura primaria dei ligandi dei recettori, mentre in altri casi i peptidi imitano il legame di ligandi non peptidici [102]. Di seguito sono elencati alcuni risultati pubblicati in letteratura, dove librerie di peptidi casuali hanno fornito antagonisti per le interazioni ligando proteina-proteina e proteina- nonpeptide in vivo e in vitro [103].

Identificazioni dei ligandi peptidici

Streptavidin	(Devlin et al., 1990; Kay et al., 1993; McLafferty et al., 1993)
Concanavalin A	(Oldenburg et al., 1992; Scott et al., 1992)
I-ILA-DR's	(Hammer et al., 1992, 1993)
Integrin ((111β3 avβ3 5β1)	(O'Neil et al., 1992; Koivunen et al., 1993; Healy et al., 1995)
S fragment of Rnase	(Smith et al., 1993)
Calmodulin	(Dedman et al., 1993; Brennan et al., 1996)
BiP	(Blond-Elguindi et al., 1993)
Urokinase cell surface receptor	(Goodson et al., 1994)
Src SH3 domain	(Cheadle et al., 1994; Rickies et al., 1994; sparks et al., 1994)
Fyn, Lyn, P13K, Abl SH3 domains	(Rickies et al., 1994)
DnaK	(Gragerov et al., 1994)
p53	(Daniels and Lane, 1994)
Single-stranded DNA	(Krook et al., 1994)
Thrombin receptor	(Doorbar and Winter, 1994) [104]

Definizione delle sequenze di substrato post-traduzionali: Un'altra applicazione importante delle librerie di peptidi casuali è stato lo sviluppo di "fagi substrato" nel 1993 da Matthews e Wells. Le librerie vengono utilizzate come mezzo per definire la specificità del substrato piuttosto che il semplice legame con una molecola bersaglio.

3.4 Visualizzazione fagica di proteine di domini proteici

Diverse proteine e domini proteici sono stati visualizzati sulle particelle del fago M13 per una varietà di scopi. Nella Tabella 1 sono state elencate molte delle proteine e i domini che sono stati visualizzati con successo. In molti casi, la proteina visualizzata dal fago mantiene la sua normale attività di legame e quella enzimatica anche quando viene fusa con l'N-terminus di PIII o pVIII maturi [105].

Tabella 1 Proteine e domini proteici visualizzati [106]

<i>Displayed protein</i>	<i>Size</i>	<i>Reference</i>
Alkaline phosphatase	Entire protein	(McCafferty et al., 1991)
Human growth hormone	1-191 aa	(Lowman et al., 1991)
Antibody a	Fab, scFv	(McCafferty et al., 1990; Barbas et al., 1991) (Roberts et al., 1992)
Bovine pancreas trypsin inhibitor	Entire protein	(Swimmer et al., 199)
Ricin	1-262, 46-143, 81-262	(Lehar et al., 1994)
Conotoxin	Entire protein	Olivera et al., 1992)
Plasminogen-activator inhibitor	Entire protein	(Pannekoek et al., 1993)
Trypsin	Entire protein	(Corey et al., 1993)
IgE receptor	a Subunit	(Robertson, 1993)
"Minibody"	61 aa	(Martin et al., 1994)
cDNA	Segments	(Cramer and Suter, 1993)

Bacterial Rop	Four helices	(Santiago-Vispo et al., 1993)
Prostate specific antigen	Entire protein	(Eerola et al., 1994)
Protein A	Domain B	(Djojonegoro et al., 1994; Kushwaha et al., 1994)
Atrial natriuretic peptide	Entire protein	(Cunningham et al., 1994)
Zif268 zinc-finger protein	Three domains	(Choo and Klug, 1994; Jamieson et al., 1994; Rebar and Pabo, 1994; Wu et al., 1995)
[β -Lactamase	Entire protein	(Soumillion et al., 1994)
APPI Kunitz domain	Domain	(Dennis and Lazarus, 1994)
Tendamistat	Entire protein	(McConnell and Hoess, 1995)
CD4	1-176 aa	(Abrol et al., 1994)
Cytokine IL-3	Entire protein	(Gram et al., 1993)
Digoxin-binding protein	Entire protein	(Tang et al., 1995)
Ecotin	Entire protein	(Wang et al., 1995)
Ciliary neurotrophic factor	Entire protein	(Saggio et al., 1995)
Glutathione S-transferase	Entire protein	(Widersten and Mannervik, 1995)

Le proteine e i domini proteici visualizzati dai fagi sono stati utilizzati in tre principali modi: evoluzione diretta, selezione di anticorpi ad alta affinità e screening dell'espressione di cDNA [107]

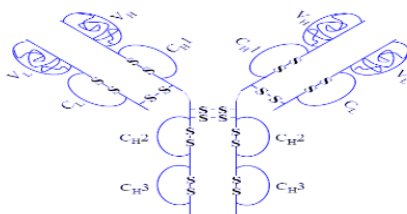
- **Evoluzione diretta delle proteine:** È stato possibile visualizzare una proteina o un dominio proteico su un fago in modo che abbia la sua normale attività di legame per una molecola bersaglio [108]. Da popolazioni di >10⁸ fagi ricombinanti, i membri con le proprietà di legame desiderate possono essere isolati mediante sequenziamento del DNA [109].

- **Isolamento di anticorpi ad alta affinità:** Una delle applicazioni più potenti del phage display è stata quella dell'ingegneria degli anticorpi [108]. Negli anni 1990-1991 da McCafferty et al., Barbas et al., e Clackson et al., sono stati espressi dei frammenti di anticorpi Fab e anticorpi con catena singola Fv sulla superficie del fago M13 senza nessuna perdita di affinità e specificità dell'anticorpo. La stimolazione della produzione di anticorpi guidata dall'antigene può essere ottenuta selezionando i leganti ad alta affinità da una libreria di anticorpi fagocitati [110]. L'elevato numero di permutazioni delle catene che si verificano durante la ricombinazione dei geni delle catene pesanti e leggere nei linfociti B clonate sotto forma di DNA (Marks et al 1992) e di proteine (Fiugini et al 1994) e attraverso l'uso della ricombinazione sito-specifica procariotica (Waterhouse et al 1993; Geoffroy et al 1994; Griffiths et al 1994) [111]. La mutazione somatica può essere abbinata all'introduzione della mutazione nelle regioni che determinano la complementarità degli anticorpi fagocitati [112]. Se bene queste tecniche siano paragonabili alla tecnologia degli anticorpi monoclonali di topo, la loro applicazione alla generazione di anticorpi umani ha fatto superare le limitazioni nella generazione di anticorpi monoclonali umani. È possibile isolare anticorpi umani da pazienti esposti a determinati agenti patogeni virali, per comprendere la risposta immunitaria durante l'infezione e generare anticorpi protettivi.

- **Screening dell'espressione di cDNA:** Un'area di crescente interesse nella biologia molecolare è la vasta rete di comunicazione tra le proteine nella cellula [113]. Questo è espresso al meglio dalle vie di trasduzione del segnale, in cui tutta una serie di domini proteici interagiscono tra loro [114]. Il ricercatore nel tentativo di dedurre queste interazioni, non è interessato a esplorare tutto lo spazio di sequenza definito da librerie di peptidi casuali, ma lo fa solo per lo spazio di sequenza definito dal genoma in esame. Il sistema yeast two-hybrid è un utile strumento per definire le interazioni proteina-proteina. Recentemente ci sono altri sistemi di phage display in grado di svolgere una funzione simile. È possibile esprimere proteine codificate da cDNA sulla superficie dei fagi, che possono poi essere testate in vitro contro un particolare bersaglio immobilizzato mediante arricchimento con biopanning [115]. Questi sistemi includono un vettore in cui segmenti di cDNA sono espressi al C-terminus della proteina contenente il dominio di dimerizzazione afos, che viene poi assemblata sull' capsid de fago contenente il

dominio di dimerizzazione jun [116]. Un altro approccio consiste nel fondere cDNA direttamente alla terminazione carbossilica dei pVI. La selezione diretta delle interazioni proteina -proteina si è dimostrato possibile anche con le librerie fagiche[117]. Affinché le molecole del fago M13 siano infettive devono essere presenti entrambi i domini quello amminico e quello carbossilico di pIII. È stato possibile esprimere la proteina bersaglio come proteina di fusione con la metà carbossi-terminale della pillola separatamente da segmenti di cDNA che sono stati espressi e fusi con il dominio amino-terminale della pillola; quando i domini della proteina bersaglio e di particolari cDNA espressi interagiscono, i due domini pIII vengono riuniti e le particelle fagiche risultanti riacquistano infettività [118]. Sebbene i sistemi fagici siano privi di modificazione post-traduzione, offrono una serie di vantaggi, tra cui la possibilità di costruire librerie di dimensioni maggiori, non che di dimostrare un'interazione diretta quando viene eseguita la procedura di biopanning in vitro.

L'industria farmaceutica attualmente utilizza la tecnica di phage display in maniera molto ampia per lo screening di anticorpi e peptidi. Un grande successo è stato la scoperta e la commercializzazione del Adalimumab (HUMIRA) farmaco per il trattamento dell'artrite reumatoide, della psoriasi e delle malattie di infiammazione intestinali (figura 11) (da parte di Cambridge Antibody Technology e Abbott Laboratories. È un anticorpo monoclonale che riconosce come antigene il TNF-alfa (Tumor necrosis factor). È stato approvato da FDA nel 2002, ed il primo anticorpo completamente umano sul mercato, il più venduto dal 2013. L'adalimumab ad oggi è riconosciuto come il farmaco più importante al mondo.



▼ **Figura 11** Adalimumab formula di struttura [119]

3.5 Dai peptidi ai farmaci via phage display

Grazie al loro minor costo di produzione i peptidi stanno emergendo nel campo farmaceutico come una nuova classe affidabile di terapie, e si stanno affermando come aspiranti farmaci perfetti. La scoperta dei farmaci è un processo che richiede un'analisi ad ampio raggio, l'elevato costo di produzione e la necessità di numerosi studi clinici per verificare la tollerabilità, la tossicità, e l'efficacia delle molecole candidate, ritardano la produzione di farmaci commerciabili, facendo così aumentare il prezzo. Conseguentemente si rendono proibitivi per la maggior parte dei pazienti. In questo contesto i peptidi grazie alla loro biocompatibilità, riproducibilità complessiva dei loro processi sintetici, e i loro bassi costi di produzione, rappresentano un'interessante alternativa nel campo farmaceutico. Durante il processo dello sviluppo dei farmaci precisamente nella fase degli studi clinici i peptidi recentemente hanno guadagnato molto terreno. I peptidi sono delle piccole molecole composte da 2-50 aminoacidi utili per il targeting e lo studio delle interazioni proteina-proteina grazie alla loro elevata selettività per il loro target [120]. Possono stimolare oppure interferire con il legame recettore-ligando, alternando o ripristinando i processi metabolici molecolari [121]. I peptidi possono essere utilizzati anche per la somministrazione di farmaci trasportando molecole bioattive o nanoparticelle a tessuti specifici [122]. Una delle scoperte più importanti nella scoperta dei farmaci è stata la scoperta dei farmaci mirati. Questo approccio implica l'identificazione di un target particolare come un recettore o una via o un gene che è coinvolto nello sviluppo e nella progressione della patologia. Segue uno screening ad alto rendimento delle librerie chimiche di piccole molecole, che consente l'identificazione di un pool di composti target-specifici [123]. L'approccio farmacologico inverso ha portato a uno spostamento verso un approccio combinatorio in cui viene eseguito uno screening in vitro ad alto rendimento di diversi tipi di librerie peptidiche o proteiche contro un target biologico selezionato [124]. Tra le tecnologie di visualizzazione in vitro attualmente disponibili, la phage display è la più utilizzata. Phage display è un potente strumento che consente ai ricercatori di identificare e isolare peptidi con elevata affinità e specificità per il target di interesse [125]. Il potere della visualizzazione dei fagi deriva da due caratteristiche distintive: 1-l'instaurazione di una connessione fisica tra il fenotipo (il peptide visualizzato) e il genotipo (la sequenza di DNA che codifica per il peptide

visualizzato) all'interno della stessa particella virale; 2- la produzione di librerie ampie e diversificate di peptidi visualizzate sulla superficie delle particelle di fagi [126]. Tuttavia l'applicazione principale della phage display nel campo farmaceutico, rimane la scoperta, l'ottimizzazione e la diagnostica di terapie a base di proteine e peptidi. Questa tecnica negli ultimi anni è stata considerata lo strumento pionieristico che ha portato allo sviluppo di una linea di tubazioni per farmaci, per portare nella clinica le terapie peptidiche. È continua e continuerà a fornire candidati redditizi per lo sviluppo dei farmaci, rafforzando così l'arsenale di opzioni bioterapeutiche disponibili. I peptidi sono particolarmente efficaci nel processo di scoperta dei farmaci, grazie alla loro apparente capacità di 'inserirsi' sui siti attivi o biologicamente rilevanti di bersagli proteici.

- Alcuni peptidi originati tramite il phage display:

Ecallantide è un inibitore della piccola proteina callicreina (serina proteasi) viene utilizzato nel trattamento dell'angioedema ereditario.

Romiplostim è un potente mimetico funzionale della tromboproteina, viene utilizzato nel trattamento della porpora trombocitopenica immunitaria si tratta di una malattia autoimmune.

Tanzeum un agonista del recettore del peptide-1 simile al glucagone viene utilizzato nel trattamento del diabete mellito tipo 2 negli adulti.

In seguito nella tabella2 sono state elencate una serie di peptidi di funzioni diverse, scoperte più recentemente.

Tabella2

Target name	Peptide name	First approval	Approved indication(s)
GLP-1 receptor	Exenatide ⁴⁶²	2005	Indicated for Type 2 Diabetes Mellitus
	Liraglutide ⁴⁶³	2009	
	Lixisenatide ⁴⁶⁴	2013	
	Albiglutide ⁴⁶⁵	2014	
	Dulaglutide ⁴⁶⁶	2014	
	Semaglutide ⁴⁶⁷	2017	
GLP-2 receptor	Teduglutide ⁴⁶⁸	2012	Treatment of Short bowel syndrome and malabsorption
GC-C receptor	Linaclotide ⁴⁶⁹	2012	Treatment of irritable bowel syndrome (IBS) with constipation and chronic idiopathic constipation
Calcitonin receptor	Pramlintide ⁴⁷⁰	2005	Treatment of Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus
GnRH receptor	Abarelix ⁴⁷¹	2003	Treatment of advanced prostate cancer
	Degarelix ⁴⁷²	2008	
Binding to active site of the 20S proteasome	Carfilzomib ⁴⁷³	2012	Treatment of multiple myeloma
NOD2 protein	Mifamurtide ⁴⁷⁴	2009	Treatment of high-grade, resectable, non-metastatic osteosarcoma
Somatostatin receptors	Lutetium Lu 177 dotatate ^{494,495}	2018	Treatment of somatostatin receptor-positive gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors Indicated for diagnose somatostatin receptor positive neuroendocrine tumors
	Edotreotide gallium	2019	
	Ga-68 ^{496,497}		

Capitolo 4. Nuovo inibitore C3 mirato Pegcetacoplan per l'emoglobinuria parossistica notturna

4.1 Introduzione

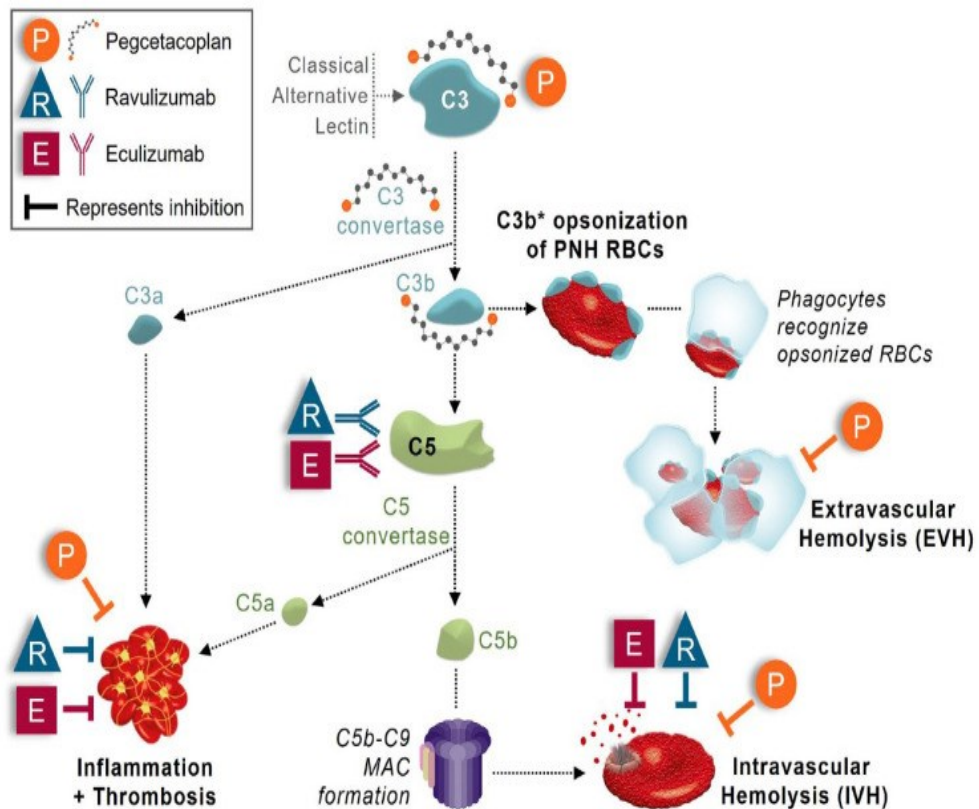
L'emoglobinuria parossistica notturna (EPN) è una rara malattia ematologica acquisita caratterizzata da emolisi mediata dal complemento, trombosi e vari gradi di disfunzione del midollo osseo [127]. La lisi mediata dal complemento dei cloni di globuli rossi (RBC), una delle principali manifestazioni cliniche della EPN, è causata dalla mancanza di proteine funzionali legate al GPI CD55 e CD59 sulla loro superficie per proteggerle da questo processo [128]. Questa carenza di regolatori inibitori chiave della via del complemento sulla superficie dei globuli rossi li rende particolarmente suscettibili al complesso di attacco alla membrana (MAC), che porta alla lisi in presenza di attivazione del complemento [129]. Nella EPN, l'attivazione incontrollata del complemento porta all'emolisi intravascolare (IVH) mediata dalla formazione di C3b con conseguente attività di convertasi C5 e successivo assemblaggio del MAC [130]. L'IVH si presenta clinicamente con livelli ridotti di emoglobina, livelli sierici aumentati di lattato deidrogenasi ([LDH] che è un enzima rilasciato dai globuli rossi lisati) e bilirubina (che è un prodotto del catabolismo dell'eme) e un'elevata conta assoluta dei reticolociti ([ARC] dovuta alla produzione compensativa di globuli rossi da parte del midollo osseo) [131]. A causa dell'emolisi cronica, gli individui affetti da EPN possono sviluppare anemia cronica, che a sua volta può avere conseguenze debilitanti, tra cui affaticamento, dispnea e dolore, contribuendo a compromettere la qualità della vita (QoL) [132]. Sebbene la sua prevalenza globale sia poco studiata, si stima che la EPN colpisca fino a 16 individui per milione in tutto il mondo [133]. Un'analisi del 2020 dei dati dell'International PNH Registry – un archivio mondiale, osservazionale e non interventistico di dati sulla sicurezza, efficacia e qualità della vita (QoL) di pazienti con EPN confermata ha rivelato che l'età media all'esordio della malattia è di 35,5 anni [134]. Prima dello sviluppo di Eculizumab, e successivamente di Eavulizumab,

per inibire l'attivazione terminale del complemento con il blocco C5, non esistevano terapie approvate dalla Food and Drug Administration (FDA statunitense) per la EPN [135]. Sebbene la terapia con C5-inibitore (C5i) abbia migliorato gli esiti per i pazienti affetti da EPN, molti pazienti trattati con C5i manifestano emolisi residua mediata dal complemento, anemia irrisolta e complicanze correlate all'anemia (ad es. onere trasfusionale, affaticamento e QoL compromessa) [136]. Pegcetacoplan è il primo inibitore del complemento mirato al C3 che è stato approvato per il trattamento di adulti con emoglobinuria parossistica notturna (EPN) che rimangono anemici dopo trattamento con un inibitore di C5 per almeno 3 mesi, FDA il 14 maggio 2021, EMA dicembre 2022 e da AIFA nel 2022. Pegcetacoplan fornisce un nuovo approccio per prevenire l'emolisi mediata dal complemento prendendo di mira la proteina prossimale del complemento C3, un componente che si trova a monte di C3 [137]. Pertanto, l'inibizione di C3 con pegcetacoplan può fornire il controllo sull'attivazione del complemento sia prossimale che terminale e prevenire rispettivamente l'emolisi extravascolare e intravascolare [138].

4.2 Fisiopatologia e manifestazioni cliniche di EPN

La EPN è causata da mutazioni somatiche nel locus del gene del fosfatidilinositolo glicano di classe A (PIGA) legato all'X delle cellule staminali ematopoietiche [139]. *PIGA* codifica per una delle numerose proteine coinvolte nella prima fase della biosintesi dell'ancora del glicosilfosfatidilinositolo (GPI) [140]. Mentre un certo numero di mutazioni PIGA è stato osservato in pazienti con EPN, la maggior parte sono localizzate nell'esone 2 del gene e determinano la grave carenza o l'assenza di ancore GPI [141]. Le ancore GPI integrano più di 20 diverse proteine, comprese le proteine inibitrici del complemento CD55 e CD59, nella membrana delle cellule ematopoietiche, determinando la loro espressione sulla superficie cellulare [142]. L'espressione della superficie cellulare CD55 e CD59 protegge i globuli rossi (RBC) dalla lisi mediata da distinte molecole del complemento e dal complesso di

attacco alla membrana (MAC) [143]. Il CD55, o "fattore di accelerazione del decadimento", regola la cascata prossimale del complemento prevenendo la formazione della convertasi C3 legata alla membrana, accelerando il decadimento della convertasi C3 e infine inibendo la conversione di C3 in C3b e C3a [144]. CD59 previene l'attività del complemento terminale bloccando l'aggregazione di C9 con altre molecole componenti (C5b, C6, C7, C8) necessarie per la formazione di MAC, prevenendo così l'emolisi intravascolare [145]. La carenza o l'assenza di CD55 e CD59 determina quindi un'emolisi cronica mediata dal complemento nei pazienti con EPN e una riduzione superiore al 90% della durata della vita dei globuli rossi EPN rispetto ai globuli rossi normali [146]. Il C3b svolge un ruolo centrale nell'emolisi mediata dal complemento nella EPN contribuendo all'opsonizzazione dei globuli rossi clonali (da parte del C3b e dei suoi prodotti di degradazione) che porta all'emolisi extravascolare e alla formazione della convertasi C5, che porta alla generazione di C5b, alla formazione di MAC e alla emolisi intravascolare (figura 12) [147]. L'emolisi cronica associata alla EPN si manifesta distintamente a seconda che sia dovuta a emolisi intravascolare o extravascolare. L'emolisi intravascolare si presenta clinicamente come diminuzione dei livelli di emoglobina e aumento dei livelli sierici di lattato deidrogenasi ([LDH] un enzima rilasciato dai globuli rossi lisati, aumento di bilirubina (prodotto del catabolismo dell'eme) e un'elevata conta assoluta dei reticolociti (ARC) a causa del midollo osseo produzione compensativa di globuli rossi [148]. L'emolisi intravascolare residua nei pazienti che ricevono la terapia con C5i può verificarsi per diversi motivi, tra cui il progresso farmacocinetico (ad esempio a causa di un dosaggio insufficiente di C5i), il progresso farmacodinamico (cioè l'attivazione del complemento nel contesto di una condizione di amplificazione del complemento) o rari polimorfismi genetici di C5 [149]. L'emolisi extravascolare mediata da C3 può verificarsi in pazienti con EPN nonostante la terapia con C5i e ha una presentazione clinica leggermente diversa in cui i livelli di bilirubina e ARC, ma non necessariamente LDH, sono aumentati [150].



▼ **Figura 12** La cascata del complemento e gli inibitori del complemento approvati dalla FDA statunitense, dall'EMA e dall'Agenzia australiana per i beni terapeutici per il trattamento della EPN [Pegcetacoplan (P); Eculizumab (E); e Ravulizumab (R)]. Inibendo C3 e C3b, pegcetacoplan esercita un'ampia inibizione della cascata del complemento, riduce il rischio di trombosi e previene sia l'emolisi intravascolare che l'emolisi extravascolare. Gli inibitori C5 eculizumab e ravulizumab possono ridurre la trombosi e l'emolisi intravascolare ma non affrontano l'emolisi extravascolare. EVH, emolisi extravascolare; IVH, emolisi intravascolare; MAC, complesso di attacco alla membrana; EPN, emoglobinuria parossistica notturna; RBC, globuli rossi. [151]

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9340389/bin/10.1177_20406207221114673-fig1.jpg

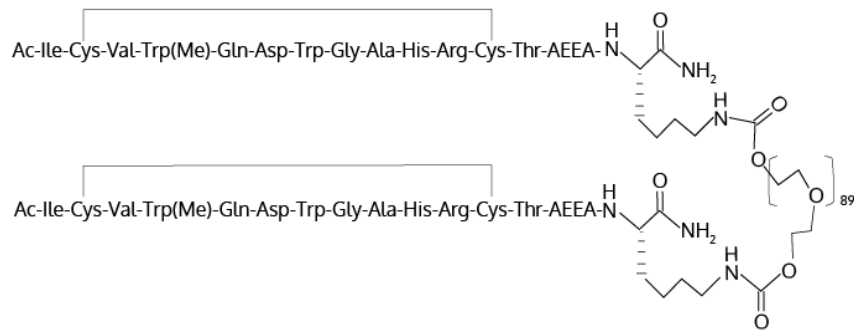
- **Manifestazioni cliniche di EPN:** EPN viene classificata in tre sottotipi; (1) EPN classica, che comprende pazienti emolitici e trombotici che presentano evidenza di

EPN in assenza di un'altra malattia da insufficienza del midollo osseo; (2) EPN nel contesto di altre malattie primarie del midollo osseo, come l'anemia aplastica o la sindrome mielodisplasia; e (3) EPN subclinica, in cui i pazienti hanno piccoli cloni di EPN ma nessuna evidenza clinica o di laboratorio di emolisi o trombosi. Questi sottotipi vengono associati a diverse implicazioni per la QoL dei pazienti affetti da questa rara malattia. Mentre i pazienti con EPN subclinica possono condurre una vita normale, i pazienti con malattia clinicamente significativa manifestano segni e sintomi di EPN che possono essere debilitanti e influire sulla loro QoL [152]. La sintomatologia dei pazienti affetti da EPN è ben documentata, percentuali sostanziali di pazienti presentano una varietà di sintomi, dati questi riferiti dai medici di base. L'affaticamento era il più comune (80,0%), dispnea (45,3%), emoglobinuria (45,0%), dolore addominale (35,2%), disfagia (16,5%) e disfunzione erettile (24,2% dei dichiaranti maschi).

4.3 La scoperta di APL-2/pegcetacoplan

Empaveli (pegcetacoplan, APL-2) è un farmaco C3 peghilato che comprende due copie dall'analogo della compstatina di seconda generazione APL-1/POT collegata da una parte PEG (glicole polietilenico) di 40 kDa per migliorare la resistenza plasmica e di conseguenza di aumentare l'emivita).

Le porzioni peptidiche appartenenti a pegcetacoplan contengono 1-metil-L-triptofano (Trp (Me)) in posizione 4 e acido ammino(etossietossi)acetico (AEEA) in posizione 14. Ha un peso molecolare di circa 43,5 kDa. La sua formula molecolare è C1970H3848N500947S4. La struttura di pegcetacoplan è mostrata di seguito (figura 13).



▼ **Figura13** Struttura chimica di Pegcetacoplan [153]

Le compstatine comprendono una famiglia di peptidi ciclici strutturalmente correlati che si legano selettivamente al C3 di primati umani e non umani e ne inibiscono la scissione da parte delle convertasi C3, agendo come inibitori dell'interazione proteina-proteina che blocca l'accesso delle convertasi al loro substrato C3 [154]. Il capostipite della famiglia di compstatine, un peptide dei 13 amminoacidi legato a un disolfuro, è stato scoperto nel 1996 attraverso lo screening di librerie di peptidi con la tecnica di phage display utilizzando il C3b come "esca". La parte farmacologicamente attiva di pegcetacoplan è l'analogo della compstatina di seconda generazione 4(1MeW)7W (cp05), scoperto dal gruppo Lambris attraverso una modifica mirata del peptide e la N-metilazione del backbone dello scaffold della compstatina [155]. Questo analogo della compstatina è stato concesso in licenza dall'Università della Pennsylvania alla Potentia Pharmaceuticals nel 2006 ed è stato inizialmente sviluppato come POT-4 per il trattamento delle forme secche e neovascolari (essudative) della degenerazione maculare legata all'età (AMD) [156]. Nonostante l'avanzamento della sperimentazione di fase 2 nella AMD umida in collaborazione con Alcon, il composto ha mostrato limitati segni di efficacia, probabilmente a causa di un dosaggio insufficiente [157]. Dopo il passaggio del programma di sviluppo clinico di Potentia ad Apellis Pharmaceuticals e la ridenominazione del candidato farmaco in APL-1, è stato avviato un approccio di peghilazione per aumentare l'emivita del farmaco peptidico [158]. In APL-2/pegcetacoplan un PEG linker funge da ponte molecolare per distanziare due società del peptide APL-1 coniugate a entrambe le estremità del linker [159]. Oltre all'uso approvato nel trattamento del EPN Apellis sta sviluppando e valutando

questo farmaco per varie indicazioni, tra cui malattie neurologiche, renali e oftalmiche. È da notare che la peghilazione dell'analogo della compstatina corrispondente all' APL-1 era già descritta nel 2005 in Canada in un brevetto depositato da Lambris e Katragadda.

4.4 L'approvazione del Pegcetacoplan

Fornendo un intervento terapeutico distinto dal trattamento anti-C5 della emoglobinuria parossistica notturna (EPN), l'approvazione del pegcetacoplan (Empaveli, Apellis) segna una svolta nella storia terapeutica del complemento che potrebbe cambiare il corso della gestione clinica di molte malattie del complemento per le quali la terapia anti-C5 ha dato risposte miste o insufficienti [160]. L'introduzione clinica del primo inibitore mirato al C3 non solo consente una modulazione del complemento su misura nelle malattie guidate o esacerbate dalla disregolazione del C3, ma rappresenta anche un'importante convalida dell'inibizione prolungata del C3 come strategia terapeutica [161]. Per molti anni, gli approcci mirati al C3 sono stati esaminati per il loro impatto potenzialmente compromettente sulla difesa immunitaria, tali preoccupazioni sulla sicurezza si basavano sul ruolo ben riconosciuto del C3 nella risposta immunitaria innata contro gli agenti patogeni e sulle osservazioni cliniche condotte su pazienti con deficit di C3 [162]. Le discussioni scientifiche sono rimaste incentrate su questo aspetto, anche dopo che i primi studi clinici sugli inibitori del C3 hanno rilevato profili di sicurezza ragionevoli e gli studi preclinici hanno evidenziato un ruolo ridondante o addirittura apposto del C3 nella sorveglianza dei patogeni [163]. Grazie a pegcetacoplan e altri membri della famiglia delle compstatine, siamo finalmente aggiunti a una valutazione della sicurezza più equilibrata e basata sull'evidenza che colloca gli inibitori C3, insieme agli agenti anti-C5, in quelle modalità terapeutiche il cui rischio può essere gestito con successo attraverso un attento monitoraggio e la vaccinazione profilattica contro alcuni batteri incapsulati [164]. L'approvazione

di Empaveli ribadisce il concetto che gli inibitori C3 possono offrire un ampio beneficio terapeutico ai pazienti con esigenze cliniche insoddisfatte, a condizione che venga messa in atto un'accurata strategia di riduzione del rischio [165]. Il caso di Empaveli è un esempio illustrativo di una ricerca condotta in ambito accademico che è stata trasferita con successo alla pipeline aziendale in una fase già matura [166]. La sua approvazione clinica segna il culmine di un rigoroso e lungo lavoro di ricerca e sviluppo da parte del Prof. John Lambris un immunologo di spicco che è stato il pioniere dell'inibizione del complemento mirato al C3 [167]. Il potenziale clinico degli inibitori della C3 a base di compstatina nella malattia di EPN è stato dimostrato per la prima volta nel 2014 quando l'analogo della compstatina di terza generazione Cp40, insieme al suo derivato peghilato, ha dimostrato di abrogare sia l'emolisi intravascolare mediata da MAC sia l'opsonizzazione degli eritrociti della EPN [168]. L'approvazione clinica di Empaveli avvenuta il 14 maggio del 2021 da FDA porta la famiglia di inibitori C3 della compstatina nella fase principale della modulazione clinica del complemento accanto agli anti-C5. Inoltre, segna una convalida clinica a lunga attesa della sicurezza e dell'efficacia più ampia degli inibitori C3 in malattie invalidanti come la EPN [169]. I dati derivati dagli studi clinici completati come nel caso di Empaveli, o studi ancora in corso, sugli inibitori della C3, confermano che la somministrazione sistemica di inibitori della C3 non solo è fattibile, ma può anche saturare adeguatamente la concentrazione plasmatica di C3, garantendo così un'inibizione duratura. L'arrivo di pegcetacoplan in clinica è un grande successo per Apellis, inoltre, segna il culmine del lungo, duraturo e prolifico percorso scientifico di John Lambris nella scoperta, nell'ottimizzazione e nel progresso clinico degli inibitori C3 a base di compstatina.

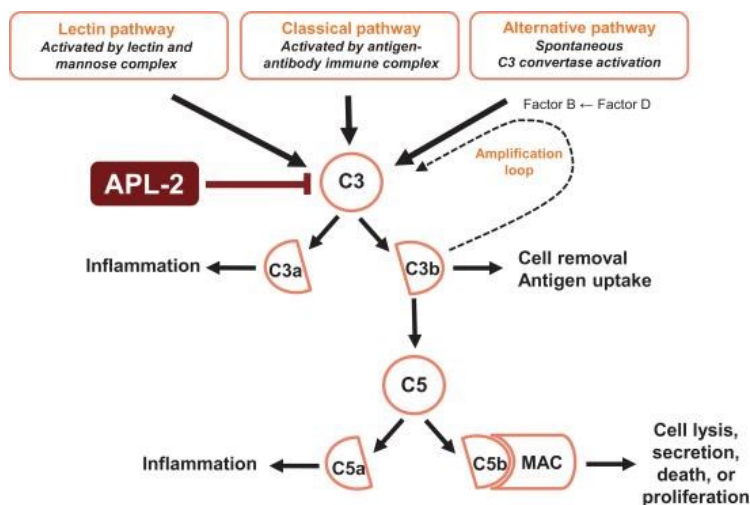
4.5 Proprietà farmacologiche del pegcetacoplan

Il pegcetacoplan appartiene alla categoria dei farmaci immunosoppressori e immunosoppressori selettivi. L'iniezione di Empaveli è una soluzione acquosa sterile, limpida, da incolore a leggermente giallastra per uso sottocutaneo ed è

fornita in un flaconcino monodose da 20 ml. Ogni 1 mL di soluzione contiene 54 mg di pegcetacoplan, 41 mg di sorbitolo, 0,384 mg di acido acetico glaciale, 0,490 mg di sodio acetato triidrato e acqua per preparazioni iniettabili USP. Empaveli può anche contenere idrossido di sodio e/o acido acetico glaciale aggiuntivo per l'adeguamento a un pH target di 5,0.

a) Farmacodinamica

Meccanismo d'azione (vedi figura 14): Pegcetacoplan è una molecola simmetrica formata da due pentadecapeptidi identici legati covalentemente alle estremità di una molecola lineare di PEG da 40 kDa [170]. Le frazioni peptidiche si legano al complemento C3 ed esercitano un'ampia inibizione della cascata del complemento. La frazione di PEG da 40 kDa conferisce una migliore solubilità e un tempo di permanenza più lungo nell'organismo dopo la somministrazione del medicinale [171]. Pegcetacoplan si lega con alta affinità alla proteina C3 del complemento e al suo frammento di attivazione C3b, regolando in tal modo il clivaggio di C3 e la generazione degli effettori a valle dell'attivazione del complemento. Nell'EPN, l'emolisi extravascolare è favorita dall'opsonizzazione mediata da C3b mentre l'emolisi intravascolare è mediata dal complesso di attacco alla membrana (MAC) a valle [173]. Pegcetacoplan svolge un'ampia azione di regolazione della cascata del complemento agendo a livello prossimale sulla formazione di C3b e MAC, controllando in tal modo i meccanismi che causano l'emolisi extravascolare e intravascolare [174].



▼ **Figura14** Meccanismo d'azione di pegcetacoplan [175]

Effetti farmacodinamici: Nello studio APL2-302, la concentrazione media di C3 è aumentata da 0,94 g/L al basale a 3,83 g/L alla Settimana 16 nel gruppo trattato con pegcetacoplan [176]. La percentuale basale di eritrociti nell'EPN di tipo II + III è risultata pari al 66,80%, per poi aumentare fino al 93,85% alla Settimana 16 [177]. La percentuale media di eritrociti nell'EPN di tipo II + III con deposito di C3 è risultata pari al 17,73% al basale, per poi diminuire allo 0,20% alla Settimana 16 [178].

Efficacia e sicurezza clinica: L'efficacia e la sicurezza di EMPAVELI in pazienti con EPN sono state valutate in uno studio di fase 3 (APL2-302), che comprendeva un periodo randomizzato, in aperto, controllato con un comparatore attivo, della durata di 16 settimane, seguito da un periodo di 32 settimane in aperto. Nello studio sono stati arruolati pazienti con EPN che erano stati trattati con una dose stabile di eculizumab per almeno i 3 mesi precedenti e che presentavano livelli di emoglobinaa <10,5 g/dL [179].

b) Farmacocinetica

Assorbimento: Pegcetacoplan è somministrato mediante infusione sottocutanea e viene gradualmente assorbito dalla circolazione sistemica con un Tmax mediano compreso tra 108 e 144 ore (4,5-6,0 giorni) dopo una singola dose sottocutanea somministrata a volontari sani [180]. Le concentrazioni sieriche allo stato stazionario dopo la somministrazione di due dosi settimanali da 1080 mg in pazienti con EPN sono state raggiunte circa 4-6 settimane dopo la prima dose e le concentrazioni sieriche medie (%CV) allo stato stazionario erano comprese tra 655 (18,6%) e 706 (15,1%) µg/mL nei pazienti trattati per 16 settimane [181]. Le concentrazioni allo stato stazionario nei pazienti (n = 22) che hanno continuato a ricevere pegcetacoplan fino alla Settimana 48 erano pari a 622,94 µg/mL (39,7%), il che indicava il mantenimento delle concentrazioni terapeutiche di pegcetacoplan fino alla Settimana 48 [182]. La biodisponibilità di una dose di pegcetacoplan somministrata per via sottocutanea è stimata al 77% sulla base dell'analisi farmacocinetica di popolazione [183].

Distribuzione: Il volume medio di distribuzione (%CV) di pegcetacoplan è di circa 3,9 L (35%) nei pazienti con EPN sulla base dell'analisi farmacocinetica di popolazione [184].

Metabolismo/eliminazione: Sulla base della sua struttura peptidica PEGilata, si prevede che pegcetacoplan sia metabolizzato per vie cataboliche e degradato in peptidi di piccole dimensioni, amminoacidi e PEG [185]. I risultati di uno studio con radiomarcatura eseguito sulle scimmie cynomolgus indicano che la principale via di eliminazione della frazione peptidica radiomarcata è rappresentata dall'escrezione urinaria [186]. Sebbene l'eliminazione del PEG non sia stata studiata, è noto che questa avviene per escrezione renale [187]. I risultati degli studi in vitro condotti indicano che pegcetacoplan non inibisce né induce le isoforme enzimatiche CYP testate [188]. Pegcetacoplan ha dimostrato di non fungere da substrato né di inibire i trasportatori di uptake ed efflusso umani [189]. Dopo somministrazioni sottocutanee ripetute di pegcetacoplan in pazienti con EPN, la clearance media (%CV) è di 0,015 (28%) L/h e l'emivita mediana effettiva di eliminazione ($t_{1/2}$) è di 8,0 giorni, come stimato nell'analisi farmacocinetica di popolazione [190].

6. Conclusioni

Il phage display è una tecnica biotecnologica molto veloce ed economica. La esposizione dei fagi del cDNA può essere utilizzata per identificare le interazioni naturali proteine-proteine, che possono essere mappate in dettaglio con metodi che utilizzano l'esposizione dei fagi come strumento per esplorare l'energia di interazione. Il suo valore aggiunto si basa sul legame fenotipo-genotipo della proteina di interesse espressa sulla superficie del fago con il DNA codificante impacchettato all'interno della particella fagica, che consente l'arricchimento selettivo dei pool di librerie e lo screening ad alto rendimento dei cloni risultanti. C'è un numero sempre crescente di prove a sostegno della premessa che le librerie di peptidi mostrate dai fagi sono utili non solo nella mappatura delle interazioni proteina-proteina, ma anche nel processo di scoperta di farmaci. Le librerie vengono utilizzate per la ricerca di nuovi farmaci bersagli, recettori cellulari e loro ligandi. La tecnologia di phage display ha un grande potenziale nel fornire i ligandi target altamente specifici che vengono continuamente richiesti dalle aziende impegnate nella scoperta di nuove terapie, diagnostica, composti di imaging medico e reagenti di ricerca. Hanno anche il potenziale di fornire l'interfaccia tra la moderna scoperta di bersagli terapeutici (genomica, proteomica e bioinformatica) e lo sviluppo di nuovi e potenti farmaci. Le ultime scoperte derivate da phage display, nel campo farmaceutico, specialmente la scoperta di Adalimumab e di Pegcetacoplan, due farmaci che hanno dato una svolta nel trattamento clinico e migliorato la qualità di vita, ha confermato per l'ennesima volta l'importanza di questa tecnica.

7. Bibliografia, Sitografia

[1],[2]

https://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?area=farmaci&id=3615&menu=med#:~:text=ogni%20sostanza%20o%20associazione%20di%20sostanze%20che%20possa%20essere%20utilizzata,di%20stabilire%20una%20diagnosi%20medica.

[3] <https://www.issalute.it/index.php/la-salute-dalla-a-alla-z-menu/f/farmaci-come-si-sviluppa-un-nuovo-farmaco>

[4][27]<https://books.google.it/books/publisher/content?id=lc3SDwAAQBAJ&hl=it&pg=PR6&img=1&zoom=3&sig=ACfU3U0K9Jgwldw--TQiBhwrOdAPm2tGdg&w>

http://www.fedoa.unina.it/cgi/oai2?verb=GetRecord&metadataPrefix=oai_dc&identifier=oai:fedoa.unina.it:12345

[28],[29] artico di Tecnologia di visualizzazione dei fagi - Applicazioni e innovazioni di Universidade de São Paulo, Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina, Marco Antonio Arap Astratto Departamento de Cirurgia, Disciplina de Urologia, São Paulo, SP, Brasil

[30] <https://www.chimica-online.it/biologia/immagini/cicli-vitali-fagi-testa-coda.jpg>

[31][32]https://www.mondadorieducation.it/content/uploads/2020/03/Biochimica_IVirus.pdf?x92133

[33] <https://www.chimica-online.it/biologia/immagini/cicli-vitali-fagi-testa-coda.jpg>

[34]-[45] Ledsgaard L, Kilstrup M, Karatt-Vellatt A, McCafferty J, Laustsen AH. Basics of Antibody Phage Display Technology. Toxins (Basel). 2018 Jun 9;10(6):236. doi: 10.3390/toxins10060236. PMID: 29890762; PMCID: PMC6024766.

[46][52]<http://www.biosci.missouri.edu/smithGP/PhageDisplayWebsite/PetrenkoSmithChemReviews.PDF>

[53]-[57] <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/cr960065d>

<https://pubs.acs.org/action/showCitFormats?doi=10.1021%2Fcr960065d&href=/doi/10.1021%2Fcr960065d#:~:text=Visualizzazione%20dei%20fagi,DOI%3A%2010.1021/cr960065d>

[58]-[67]

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165993621000510>

[68]-[70 Saw PE, Song EW. Phage display screening of therapeutic peptide for cancer targeting and therapy. Protein Cell. 2019 Nov;10(11):787-807. doi: 10.1007/s13238-019-0639-7. Epub 2019 May 28. PMID: 31140150; PMCID: PMC6834755.

[71]-[79]

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165993621000510>

[80]-[85] Saw PE, Song EW. Phage display screening of therapeutic peptide for cancer targeting and therapy. Protein Cell. 2019 Nov;10(11):787-807. doi: 10.1007/s13238-019-0639-7. Epub 2019 May 28. PMID: 31140150; PMCID: PMC6834755.

[86]-[90] <https://www.sciencedirect.com/book/9780124023802/phage-display-of-peptides-and-proteins#book-description>

[91]-[118] <https://www.sciencedirect.com/book/9780124023802/phage-display-of-peptides-and-proteins#book-description>

[119]https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/8c/Adalimumab_structure.svg/1200px-Adalimumab_structure.svg.png

[120]-[126][https://www.cell.com/trends/pharmacological-sciences/fulltext/S0165-6147\(18\)30230-X?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS016561471830230X%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/pharmacological-sciences/fulltext/S0165-6147(18)30230-X?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS016561471830230X%3Fshowall%3Dtrue)

[127]-[133] Wong RSM. Safety and efficacy of pegcetacoplan in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Ther Adv Hematol. 2022 Jul 28;13:20406207221114673. doi: 10.1177/20406207221114673. PMID: 35923770; PMCID: PMC9340389.

[134]-[152] Wong RSM. Safety and efficacy of pegcetacoplan in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Ther Adv Hematol. 2022 Jul 28;13:20406207221114673. doi: 10.1177/20406207221114673. PMID: 35923770; PMCID: PMC9340389.

[153] <https://www.ambiopharm.com/articles/an-approval-for-apellis/>

[154][167]

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1521661621001224?via%3Dihubhttps://www.sciencedirect.com/journal/clinical-immunology/vol/235/suppl/C>

[170]-[174] https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/aspaveli-epar-product-information_it.pdf

[175] <https://cdn.kscope.io/3f722e0e3a3c9628313849c15abe25c3-ggd3sslgin2x000002.jpg> <https://investors.apellis.com/node/8401/html>

[176]-[190] https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/aspaveli-epar-product-information_it.pdf