

INTERDELIVER: un bioconjugato interferone alfa-acido ialuronico per la terapia delle epatopatie virus-correlate

Azione Biotech III – ATI Fidia Farmaceutici Spa, IOV Padova, NanoFab Srl

Introduzione

La possibilità di veicolare specificamente un coniugato HA-farmaco al fegato, in seguito a semplice infusione e.v., potrebbe presentare importanti potenzialità terapeutiche nei confronti delle patologie a prevalente localizzazione epatica. In questi casi, la specificità della localizzazione imputabile al veicolo potrebbe configurare una vera e propria terapia loco-regionale (liver-focused therapy). In questo contesto, ci siamo proposti di sviluppare un nuovo farmaco biotecnologico (bioconjugato HA-IFNalfa) che possa costituire una strategia innovativa per il controllo delle epatopatie virus-correlate, grazie alla sua preferenziale localizzazione epatica..

Attività della ricerca

Le attività sono state suddivise in 5 punti:

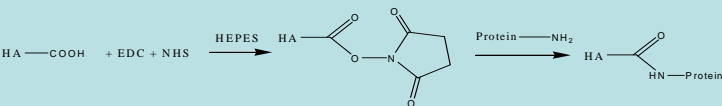
1. Clonaggio di IFNalfa umano.
2. Coniugazione tra HA e IFNalfa.
3. Validazione dell'attività anti-virale in vitro
4. Valutazione della biodistribuzione del bioconjugato
5. Analisi dell'espressione genica indotta da IFNalfa libero e coniugato.

CLONAGGIO

L' *Escherichia coli* rimane l'ospite più popolare per la produzione di proteine ricombinanti, anche se molti geni non possono essere espressi efficacemente in questo microorganismo. Al fine di clonare il gene in un vettore procariotico, sono stati isolati PBMC da donatori sani e sottoposti a stimolazione aspecifica con attivatori policlonali quali PHA e LPS. L'mRNA dai leucociti stimolati è stato retrotrascritto a cDNA ed amplificato mediante primer specifici in PCR. L'amplificato è stato quindi sequenziato ed introdotto in un vettore procariotico ad elevata efficienza di trascrizione per la successiva trasformazione batterica. L'analisi della sua funzionalità ha tuttavia evidenziato che essa manca di attività biologica, verisimilmente a causa di un "misfolding" durante la fase di rinaturazione. Per il proseguo dello studio è stata usata IFN-alfa commerciale

CONIUGAZIONE

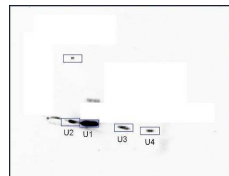
La reazione di coupling si svolge attivando con EDC ed NHS i gruppi carbossilici dell'HA; alla miscela di reazione successivamente si aggiunge la proteina



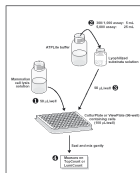
Il metodo finale vede l'uso di HA, sale sodico di Mw ca 200 kDa, sciolto in acqua. Il pH viene mantenuto tra 4.5 e 5 attraverso pH-stat per l'aggiunta di HCl 0,01 M. Dopo circa 4 hrs di reazione a temperatura ambiente, il pH viene incrementato a 7-7.5 e aggiunta la proteina. La reazione procede overnight. Si precipita il coniugato in solvente alcolico ed infine si essicca in stufa a 40°C per almeno 72 hrs. Prima di procedere con l'IFN-alfa sono state fatte alcune prove con l'emoglobina bovina che hanno dimostrato la formazione di un bioconjugato contenente la componente proteica. Si è passati quindi all'IFN-alfa, ottenendo una serie di piccolo lotti della dimensione di circa 200 mg che sono stati caratterizzati in vitro

ATTIVITA' BIOLOGICA

Questa fase della ricerca si proponeva di verificare il legame tra HA ed IFNalfa mediante quantificazione in Western Blot. I dati ottenuti evidenziano che circa un 20% di IFNalfa nel coniugato non è legato. Per quanto concerne l'attività biologica si è pertanto resa necessaria una serie di esperimenti finalizzati a valutare se il coniugato mantenesse l'attività antivirale e se tale attività fosse ridotta rispetto all'IFNalfa libero. Gli esperimenti sono stati condotti su di una linea epiteliale renale di scimmia, VERO, molto sensibile all'infezione con VSV (Vesicular Stomatitis Virus), che a sua volta è molto sensibile all'azione dell'interferone.

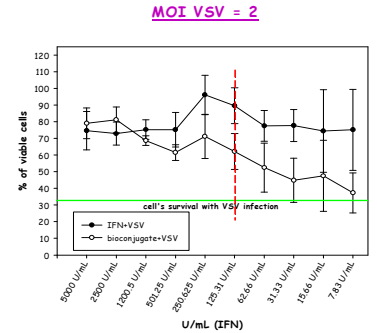


U4 = IFNalfa libero (100ng); U3 = coniugato (9ug di IFNalfa equivalenti); 8% di segnale, quindi circa 200ng sono liberi; U1 = HA+IFNalfa mescolati al momento con 9ug di IFN libero, circa un 70% di quantificazione; U2 = HA+IFNalfa mescolati al momento con 100ng di IFN libero, circa un 16% di quantificazione



Saggio ATPlite. Procedura descrittiva degli additivi impiegati nel test di citotossicità utilizzato.

La coniugazione riduce parzialmente l'attività dell'IFNalfa coniugato, che però mantiene la sua capacità di ridurre l'efficacia del VSV di inibire la proliferazione cellulare in cellule infette (Il tratteggio rosso nel grafico sovrastante sta ad indicare la concentrazione oltre la quale l'IFNalfa da solo protegge in modo statisticamente più significativo del coniugato).

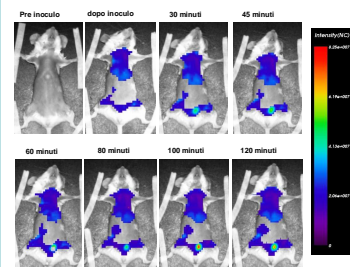


BIODISTRIBUZIONE

Questa fase della ricerca si prefiggeva di determinare la biodistribuzione del coniugato in vivo dopo somministrazione endovenosa (e.v.), al fine di verificare la sua preferenziale localizzazione epatica. Per l'esecuzione di questi esperimenti, ci siamo avvalsi dello strumento Explore Optix della ditta GE Healthcare.



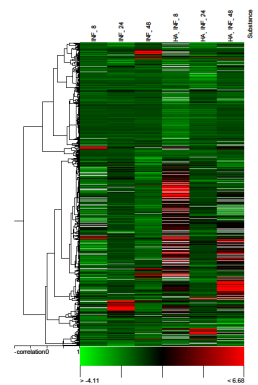
Il bioconjugato è stato coniugato a Cy5.5, un fluorocromo con eccitazione ed emissione nel NIR (near-infrared), particolarmente adatto ai laser montati nello strumento, e successivamente inoculato e.v. in topi anestezizzati. Dopo somministrazione del bioconjugato si evidenzia una distribuzione non uniforme del segnale, che risulta più intenso nell'area epatica, dove HA viene legato da recettori specifici, e meno intensamente nella contigua area polmonare, verisimilmente per intrappolamento aspecifico nel microcircolo polmonare



La figura riporta la cinetica di biodistribuzione di HA-IFNalfa coniugato a Cy5.5 ottenuta con lo strumento Explore Optix nell'arco di due ore dall'inoculo e.v.

ESPRESSIONE GENICA

Per lo studio degli effetti dell'interferone-alfa libero e di quello coniugato sull'espressione genica è stata scelta la linea cellulare di carcinoma epatocellulare umano PLC/PRF/5 (Alexander cells). Lo RNA totale estratto è stato quantificato mediante misure spettrofotometriche. Con questa tecnica, lo studio su cellule di epatocarcinoma umano HBV correlate sottoposte al trattamento con IFN-alfa libero ed con IFN-alfa bioconjugato all'acido ialuronico ha permesso di identificare i geni espressi ad ogni trattamento. Tra questi, ricordiamo quelli già noti regolati dall'IFN-alfa e altri coinvolti nella risposta immunitaria, antivirale ed oncogeno, nonché quelli coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare e proliferazione cellulare. I dati preliminari indicano che le 'signature' indotte da IFN e bioconjugato HA-IFN sono parzialmente sovrapponibili: alcune delle differenze osservate richiedono ulteriore indagine



Dendrogramma della espressione di circa 1429 geni di PLC/PRF/5

CONCLUSIONI

Nel loro insieme, i dati ottenuti indicano come gli obiettivi delle varie fasi della ricerca siano stati fondamentalmente raggiunti e sostengono la possibilità di utilizzare HA come una matrice polimerica adatta alla coniugazione di proteine ad attività biologica e capace di veicolazione a livello epatico.