

RELAZIONE FINALE

Corso di Alta Formazione STRAIN-Innovazione e Trasferimento Tecnologico nel settore chimico-farmaceutico

Dott.ssa Sabrina Reale

Tutor: Prof.ssa Chiara Schiraldi

I glicosaminoglicani (GAGs), conosciuti anche come “mucopolisaccaridi “ per le loro proprietà viscoso e lubrificanti, sono polisaccaridi lineari costituiti da un numero variabile di unità disaccaridiche ripetitive nelle quali ogni disaccaride è formato da una esosamina (D-galattosamina o D-glucosamina) e un acido uronico (D-glucuronato o L-iduronato) o da un esoso neutro (D-galattoso). Tra i più importanti si annoverano l'acido ialuronico (HA), il condroitin solfato (CS), il dermatan solfato (DS), l'eparansolfato (HS), l'eparina e il cheratan solfato (KS). Il comportamento reologico dei GAGs conferisce loro funzioni di sostegno e protezione della maggior parte dei tessuti. I GAGs, per questo motivo, rappresentano una classe di carboidrati di grande interesse per l'industria farmaceutica, le cui applicazioni investono molti campi quali la rigenerazione tissutale, la medicina estetica, la cura di patologie osteo-articolari. In tali ambiti i glicosaminoglicani più comunemente utilizzati sono l'acido ialuronico (HA) e il condroitin solfato (CS).

Attualmente la produzione di condroitin solfato prevede prevalentemente l'estrazione da fonti animali. Tuttavia, la richiesta crescente di questa molecola di interesse farmaceutico, connessa con i problemi relativi alla produzione da fonti animali, ha aperto nuove prospettive per la produzione biotecnologica di condroitina. La scoperta che alcuni ceppi batterici producano una capsula contenente polisaccaridi, analoghi nella struttura ai glicosaminoglicani, pone le basi per una produzione biotecnologica di questi ultimi. L'ottimizzazione di un processo produttivo biotecnologico presenta diversi vantaggi: anzitutto permette una più semplice reperibilità delle materie prime, la cui disponibilità virtualmente è illimitata, e soprattutto si accompagna ad una maggiore sicurezza e controllo per i contaminanti virali e prionici. In ultima istanza, il processo produttivo per via fermentativa risulta facilmente implementabile in quanto ad una strategia di *strain improvement* potrebbe conseguire un incremento in resa e produttività.

Presso il Centro Regionale di Competenza in Biotecnologie Industriali della Seconda Università degli Studi di Napoli è stato possibile sviluppare processi fermentativi in bioreattori innovativi idonei a limitare l'accumulo di prodotti tossici, prolungando la crescita batterica e di conseguenza la produzione di polisaccaride capsulare. Mediante tecniche di ingegneria genetica sono stati sviluppati ceppi mutanti overproduttori del polisaccaride d'interesse. Il lavoro di ricerca ha poi riguardato lo *scale-up* per la produzione della condroitina, e quindi l'ottimizzazione di un processo di fermentazione *fed-batch* su scala pre-pilota, giungendo così ad una quantità pari a circa $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ di polisaccaride prodotto. A valle del processo fermentativo per la purificazione e il recupero del polisaccaride dal surnatante del brodo di fermentazione sono stati inoltre valutati processi di ultrafiltrazione/diafiltrazione, indagando la selettività di membrane di diverso taglio molecolare, per isolare il polisaccaride rispetto ai contaminanti presenti. Il prodotto ottenuto con una purezza intorno all'80% è stato sottoposto a trattamenti con carbone e a precipitazioni con solventi organici. In questo modo si è riusciti ad ottenere un prodotto con una purezza vicino al 100% e privo di endotossine, quindi utilizzabile per fini farmaceutici.

La mia personale esperienza svolta nel periodo di *training on job* ha riguardato principalmente la fase finale di purificazione della condroitina biotecnologica e la caratterizzazione di quest'ultima mediante un cromatografo ad esclusione molecolare, il Viscotek, che permette di ottenere informazioni ad elevata sensibilità circa la massa molecolare, la distribuzione del peso molecolare, la polidispersità e la viscosità intrinseca. In particolare ho lavorato al processo di depirogenazione della condroitina studiando diverse metodiche atte a rimuovere i contaminanti. Ho, dunque, sperimentato metodiche quali l'uso di solventi organici per precipitazione e l'utilizzo di carbone

attivo. L'analisi comparativa delle diverse tecniche di purificazione ha consentito di individuare quella ottimale ai fini di un'applicazione industriale sia in termini di abbattimento del contenuto endotossico sia in termini di recupero del prodotto. Durante le fasi di purificazione è stata effettuata la caratterizzazione molecolare impiegando il Viscotek, che si compone di due moduli:

il modulo GPCmax VE 2001, un sistema integrato costituito da una pompa specifica per cromatografia per gel filtrazione (GPC), un degasatore del solvente in linea e un auto campionatore; il modulo TDA302 (Triple Detector Array), che include un forno termostato per la colonna, e un triplo rivelatore, costituito da un detector ad indice di rifrazione (RI), un rivelatore viscosimetrico (VS) a 4 ponti capillari e un detector Light Scattering (LS). Quest'ultimo è a sua volta costituito da due parti: un detector Right Angle Light Scattering (RALS), caratterizzato da un ottimo rapporto segnale/rumore, e l'innovativo detector Low Angle Light Scattering (LALS), che consente di ottenere il peso molecolare assoluto, senza estrapolazioni o correzioni.

L'esperienza svolta nell'ambito del progetto STRAIN rappresenta quindi un chiaro esempio di come la ricerca di base si intrecci alla ricerca applicata, mirata a obiettivi applicativi concreti specifici. I risultati della prima hanno costituito il supporto per lo svolgimento della seconda. La ricerca applicata è alla base dello sviluppo, cioè del lavoro sistematico, fondato sulle conoscenze derivanti appunto dalla ricerca fondamentale, indirizzato al raggiungimento di obiettivi pratici sfruttabili commercialmente.

Le attività di ricerca e sviluppo svolte hanno, quindi, portato a risultati che rientrano nell'ambito della tecnologia, cioè alla definizione di un complesso di conoscenze scientifiche e pratiche, e dei procedimenti tecnici atti alla realizzazione della produzione di un prodotto farmaceutico come la condroitina biotecnologica.

L'esperienza vissuta ha riguardato, dunque, un progetto che propende allo sviluppo precompetitivo e al processo di industrializzazione, rappresentando la tendenza sempre più frequente di una ricerca applicata svolta all'interno di laboratori universitari che si interfacciano con le realtà industriali presenti sul territorio in un processo di continuo trasferimento tecnologico.

Le attività di *training on job* previste dal progetto sono state coordinate dal tutor scientifico Ing. Chiara Schiraldi, Professore Associato presso il Dipartimento di Medicina Sperimentale sez. di Biotecnologie e Biologia Molecolare della Seconda Università di Napoli e Responsabile unità di produzione biotecnologica di biomolecole di Bioteknet del Centro di Competenza in Biotecnologie Industriali.

Il CRdC in Biotecnologie Industriali Bioteknet ha messo a disposizione le strumentazioni idonee per la realizzazione del progetto. Si tratta di un rilevante patrimonio biotecnologico messo a disposizione del mondo della produzione e dell'innovazione, in un continuo processo di integrazione con le realtà industriali nazionali ed internazionali.