



Sommario delle acquisizioni ottenute fino a Dicembre 2023 (segue testo originale)

- 1) Ottenuta TGM1 intatta 90Kda
- 2) Dimostrazione di attività enzimatica (TGM1 funzionante)
- 3) Progressi nell'isolamento della proteina TGM1
- 4) Progressi sull'utilizzo dei prodotti chimici da utilizzare per lo studio
- 5) Progressi sul sistema di stoccaggio a basse temperature

Programma per il prossimo anno :

- 1) Aumentare la produzione di TGM1 su volumi maggiori
- 2) Ottimizzare le procedure chimiche di isolamento di TGM1 per non alterarne l'attività
- 3) Valutazione della stabilità della TGM1 nel tempo
- 4) Ottimizzazione dei sistemi di stoccaggio adatti a mantenere nel tempo l'attività dell'enzima
- 5) Ottimizzazione della formulazione del prototipo di Hydrogel contenente TGM1 attiva da somministrare

IV Report sulle acquisizioni per la terapia delle ARCI correlate a mutazioni in Transglutaminasi-1 per Comitato UFFI

Heiko Traupe¹, Klaus Lager², Kira Sussmuth³, Henning Wiegmann¹, Vinzenz Oji¹ e Kris Paul³

¹ Università di Munster, Dipartimento di Dermatologia

² Università di Munster, Istituto di Tecnologia Farmaceutica e Biofarmacia

³ Ospedale "Helios" Berlino-Buch, Dipartimento di Dermatologia e Allergologia

Il seguente rapporto è in particolare dedicato al progresso degli studi durante il periodo Ottobre 2022 fino a Dicembre 2023.

Nel rapporto precedente sottolineavamo come il problema più critico da risolvere fosse l'instabilità della proteina TGM1. Da un lato essa tende ad aggregare formando oligomeri (strutture formate da più molecole di TGM1) e dall'altro formando spontaneamente in seguito subunità fisiologiche (funzionanti). (V come riferimento le slides dello zoom meeting del 21 marzo 2023). Di per sé il fatto di riformare subunità fisiologiche funzionanti accresce l'attività biologica ma può portare anche alla perdita del sito di attacco che sappiamo guidare la proteina verso il suo sito di azione, la membrana cellulare del cheratinocita.

In particolare, ricordiamo che l'aggregazione in oligomeri (strutture formate da più molecole di TGM1) complica lo sviluppo di una formulazione farmaceutica con un dosaggio stabilito.

Come si specificava anche nel precedente rapporto (terzo) abbiamo iniziato uno studio preliminare su un sistema di espressione di TGM1 utilizzando il batterio Escherichia Coli, cercando di ottimizzare questo sistema di espressione. La nostra priorità era quella di acquisire una proteina (TGM1) che fosse disponibile quasi esclusivamente nella forma di monomeri di 90 Kilodalton senza che questi si frammentassero divenendo inutilizzabili e con una percentuale bassa di TGM1 aggregata (anch'essa inutilizzabile).

LAVORO SVOLTO NELL'ULTIMO PERIODO FINO A DICEMBRE 2023

Per ottenere questi risultati (v paragrafo precedente) abbiamo utilizzato molto tempo per migliorare il sistema "Escherichia Coli" di espressione di TGM1 usando differenti modificazioni del sistema come per esempio differenti temperature e diversi terreni di coltura del batterio Escherichia Coli. Normalmente è sufficiente



lavorare con una temperatura di 23 gradi circa per ottenere la proteina ricombinante TGM1. A questa temperatura si era in grado di ottenere proteina TGM1 (e altri frammenti non utilizzabili). Però la quantità maggiore della TGM1 ottenuta non era nella sua forma fisiologica funzionante di 90 Kdalton (monomero, una sola molecola fisiologica) che ci eravamo prefissati di produrre.

Per vincere questa sfida e oltrepassare questa difficoltà della frammentazione in subunità non utilizzabili durante il processo di espressione ricombinante (fatta con la “collaborazione del DNA del batterio E coli) di TGM1 sono stati sperimentati differenti approcci, trovando che diminuendo la temperatura del sistema di espressione di TGM1 tramite E Coli, il sistema forniva risultati nettamente migliori permettendo di ottenere un aumento dei monomeri (utilizzabili, funzionanti) di 90Kda diminuendo drasticamente la frammentazione in prodotti di minor peso molecolare (60Kda, non funzionanti). In definitiva, abbassando la temperatura dell’esperimento si riusciva a diminuire di molto l’attività proteasica di E Coli (che è responsabile della frammentazione di TGM1 in subunità più piccole non funzionanti) avendo come risultato monomeri di TGM1 di 90Kda fisiologici e funzionanti (v Fig 1. Fare riferimento alle figure della mail, non riportate nella traduzione)

Siamo quindi entusiasti per il risultato di questo esperimento : finalmente la produzione dei monomeri funzionanti è predominante.

Questo eccellente risultato è stato ottenuto in piccola scala su volumi di 0.25 litri e al momento stiamo

lavorando per ottenere il medesimo risultato su volumi più consistenti (fino a 2 litri), ma come previsto questo passaggio a volumi maggiori non sarà affatto di facile soluzione. Nei volumi maggiori la presenza di TGM1 in maggiori quantità tende a riaggregare le molecole rendendole non idonee.

Comunque, al momento abbiamo acquisito una quantità sufficiente di TGM1 per i successivi passaggi dello studio che riguarderanno la stabilità della molecola, vale a dire il mantenimento strutturale e l’attività di TGM1 su sistemi di 0.25 litri.

E’ intuibile comunque come nei nostri laboratori saremo in grado di testare il sistema di espressione di TGM1 in futuro fino a volumi di massimo 5 litri. Per volumi maggiori necessiterà la collaborazione in futuro di Compagnie farmaceutiche che possiedono tecnologie per la produzione di TGM1 su larga scala.

Nella ricerca di ottimizzare in seguito il sistema per diminuire la formazione di aggregati e di frammenti di TGM1 non funzionali si stanno ottenendo lusinghieri risultati con uno stabilizzatore chimico che riduce questi rischi. Inoltre, si sta sperimentando sul versante delle concentrazioni di TGM1 ricombinante ottenuta per diminuire il rischio della formazione di aggregati insolubili ed ottenere così quantità maggiori di TGM1.

Nel precedente rapporto avevamo sottolineato come, oltre alla stabilità strutturale della TGM1 da noi prodotta, bisognava parallelamente dimostrare la sua attività (enzimatica).

Per questo motivo ci siamo ripromessi di dimostrare una specifica attività enzimatica di TGM1 ottenuta col nostro sistema (ricombinazione con E Coli). Per far questo abbiamo saggiato l’attività di TGM1 con un complesso studio di transamidazione di substrati quali monodamyl-cadaverina e dimetilcaseina.

Per prima cosa abbiamo visto che lunghe conservazioni in ghiaccio secco sia della TGM1 ottenuto con il nostro sistema che di quelli già presenti nel commercio si risolvono in una perdita quasi completa dell’attività dell’enzima TGM1. Sembrerebbe che l’attività sia persa anche con conservazioni di tempo minore (circa 2 mesi). Saranno quindi necessari ulteriori esperimenti su questa variante (tempo di conservazione in ghiaccio secco\attività di TGM1) da valutare in futuro, anche bvalutando l’effettiva validità dei prodotti commerciali che utilizziamo in laboratorio per “montare” il nostro sistema di produzione di TGM1.

I dati preliminari ottenuti col nostro sistema sono migliori di quelli comparativi coi sistemi commerciali in special modo abbiamo dimostrato scarsa perdita di attività di TGM1 ottenuto da noi in laboratorio in un periodo di 7 settimane a -20°. Al contrario la conservazione di TGM1 a 4° ha rivelato una quasi completa



perdita di attività enzimatica.

Per la pratica clinica il proposito è quello di mantenere l'alta iniziale attività enzimatica per un periodo di tempo almeno di 2 mesi in condizione di stoccaggio semplificate. (sistema di stoccaggio con raffreddamento a bassa temperatura). In queste condizioni sarebbe sufficiente perdere solo una piccola quantità di attività nella formulazione finale di Hydrogel (applicabile poi sulla pelle dei pazienti) in modo da dimostrare in futuro effetti terapeutici soddisfacenti e per un adeguato periodo di tempo.

E' intuibile pensare che questi propositi si possano acquisire in un tempo maggiore e che possaano essere ottenuti nel prosieguo dell'anno 2025