

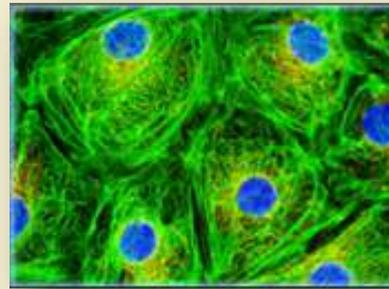
# Le Biotecnologie e la Salute Umana

Giuseppe Procino

# La ricerca scientifica e lo sviluppo della terapia



Individuare il gene alterato



Capire quali sono le conseguenze a livello cellulare



Individuare un trattamento terapeutico adeguato



Sperimentazione sull'uomo  
(sperimentazione clinica)



Sperimentarne l'efficacia su cellule isolate  
e/o su animali di laboratorio  
(studi preclinici)

La nostra ricerca con



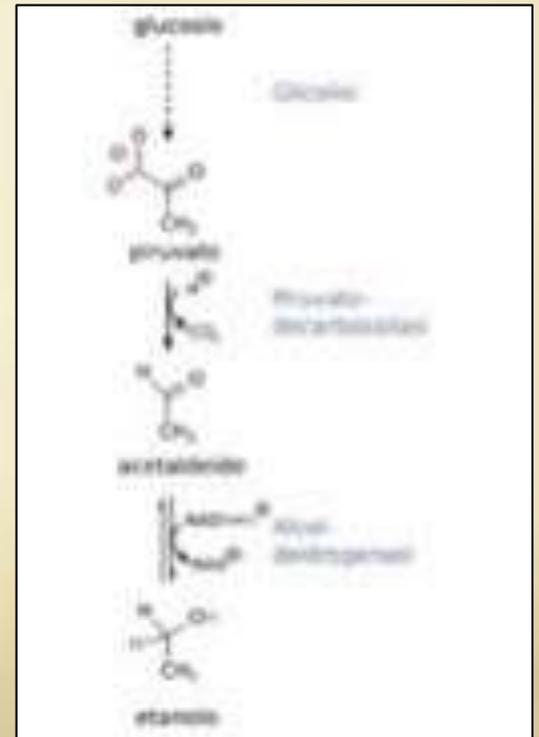
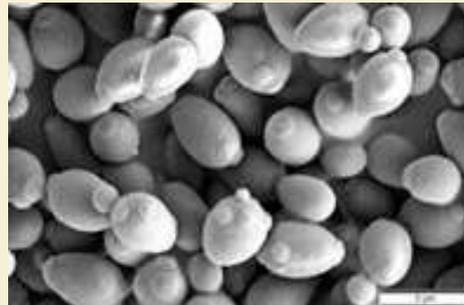
# Le biotecnologie: scienze antiche

- Le **biotecnologie** sono tecniche che usano organismi viventi o parti di essi per dare origine a prodotti utili all'uomo. Alcuni dei possibili obiettivi sono la produzione di nuovi farmaci e la costruzione di tessuti in grado di sostituire quelli umani.
- Molte persone pensano che le biotecnologie siano nate solo negli ultimi tempi, ma in realtà esistono da migliaia di anni...



# Le biotecnologie: scienze antiche

- La fermentazione degli zuccheri dell'uva in anidride carbonica ed alcool ad opera del lievito *Saccaromyces Cerevisiae* è un processo biotecnologico, iniziato nel IV sec A.C. in Mesopotamia e continuato in epoca romana.



# Le biotecnologie: scienze antiche

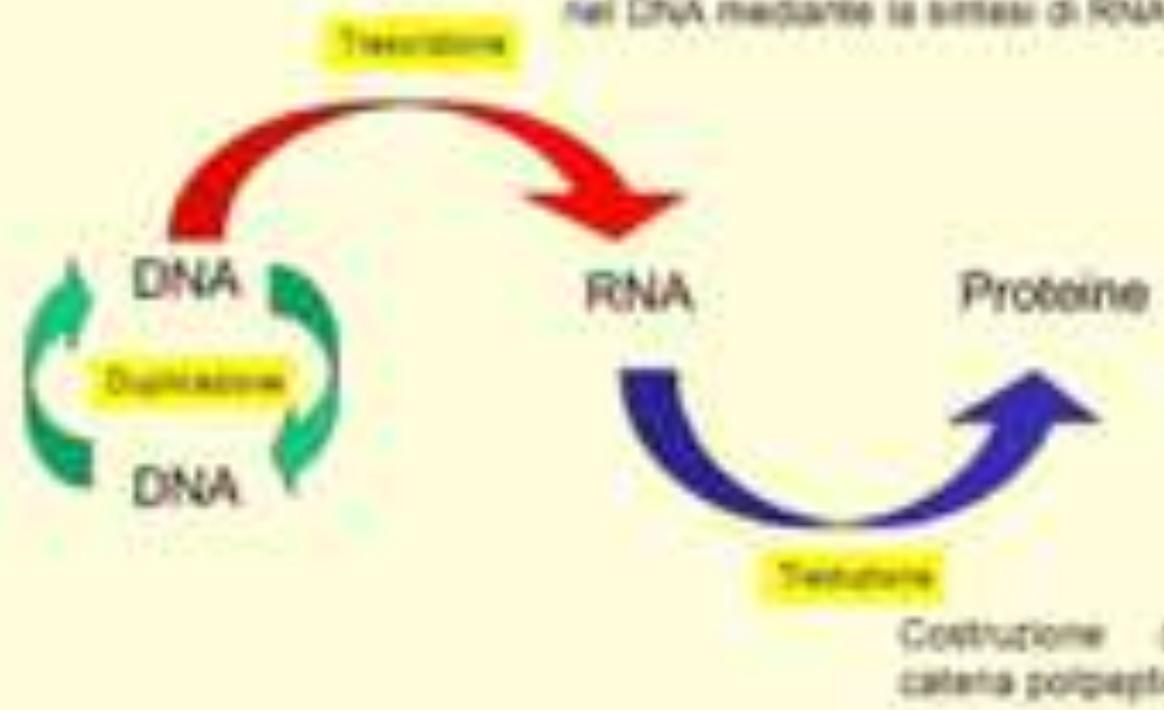
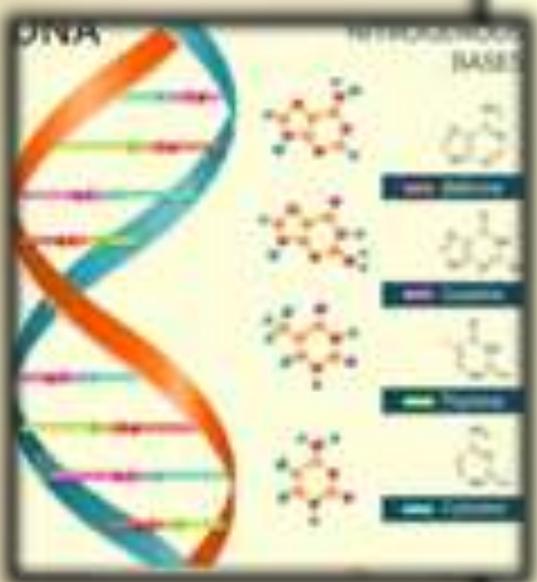
- La lievitazione del pane, la produzione di birra, formaggi e yogurt sono processi biotecnologici che utilizzano microrganismi o enzimi presenti in natura per trasformare materie prime alimentari in prodotti più gradevoli al palato, più digeribili e più facilmente conservabili.



# Le moderne biotecnologie

## IL "DOGMA CENTRALE" DELLA BIOLOGIA

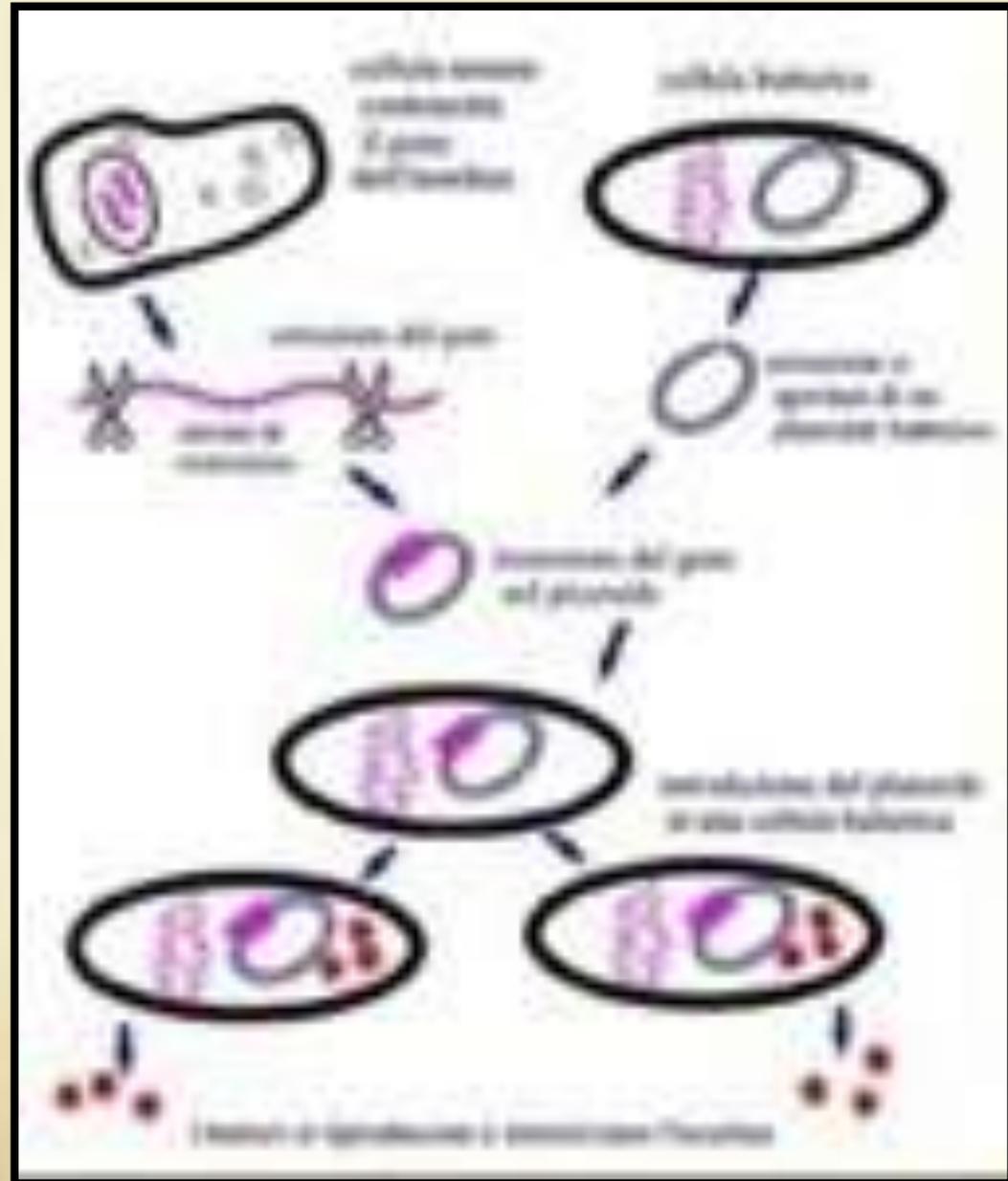
Passaggio dell'informazione contenuta nel DNA mediante la sintesi di RNA



# L'ingegneria cellulare: i batteri possono produrre proteine che agiscono come farmaci nell'uomo



- **Escherichia Coli** è un batterio che vive nel nostro intestino e partecipa al processo digestivo
- Normalmente non è patogeno.
- E' facile da coltivare in laboratorio.
- Può "leggere" geni umani e produrre proteine umane per uso terapeutico sicure ed a costi bassi.



## SISTEMI DI ESPRESSIONE PER LA PRODUZIONE DI PROTEINE RICOMBINANTI

### 1) BATTERI (*E. coli*)

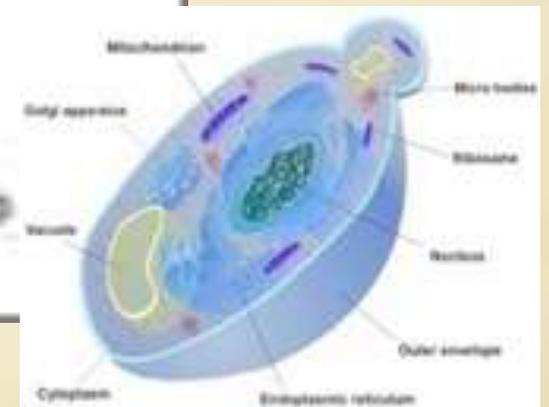
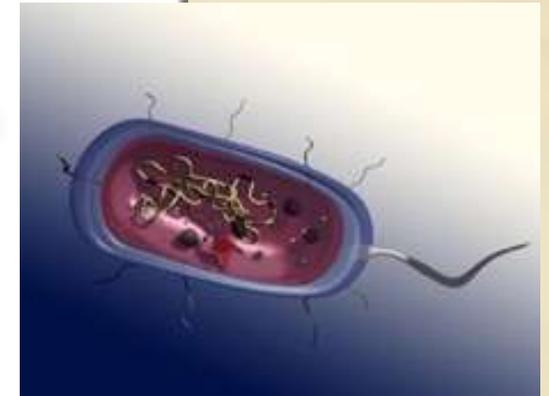
I microrganismi sono facilmente manipolabili, economici, modificabili in tempi rapidi. Tuttavia, le proteine prodotte nei batteri sono prive di modificazioni post-traduzionali. Spesso offrono proteine denaturate che necessitano di refolding. Problemi con proteine multimeriche e contenenti ponti disolfuro.



PRIMA SCELTA PER PROTEINE MEDIO-PICCOLE

### 2) LIEVITI (*S. cerevisiae*; *Pichia pastoris*)

Sono i sistemi eucariotici più semplici da coltivare. Metodo economico, relativamente efficiente, la crescita è rapida. Consentono di ottenere glicosilazioni, ma queste sono spesso specie-specifiche.



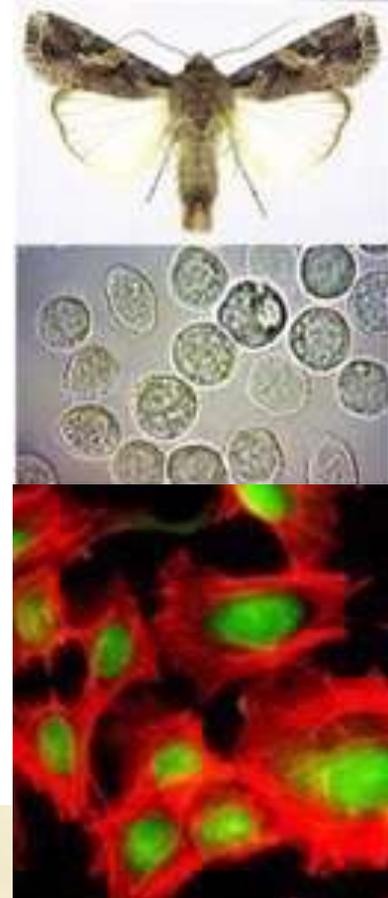
## SISTEMI DI ESPRESSIONE PER LA PRODUZIONE DI PROTEINE RICOMBINANTI

### 3) LE CELLULE IN COLTURA DI INSETTO

Consentono di ottenere glicosilazioni, ma queste sono spesso specie-specifiche. Coltura difficile e più costosa.

### 4) LE CELLULE IN COLTURA DI MAMMIFERO

Consente una corretta glicosilazione delle proteine. Le coltivazione è lenta, costosa e difficilmente consente l'ottenimento di proteine in alta resa



# Farmaci biotecnologici

- Il primo farmaco ottenuto ingegnerizzando un sistema vivente (batterico) è stato l'insulina, approvato dalla FDA nel 1982.
- Anche l'ormone della crescita umano, precedentemente estratto dai cadaveri, fu rapidamente ingegnerizzato.
- Nel 1986 la FDA approvò il primo vaccino umano, contro l'epatite B.

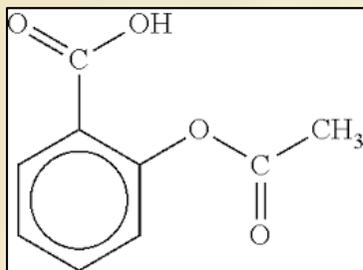


La struttura dell'insulina, ingegnerizzata, approvata dalla FDA nel 1982.

La produzione industriale di farmaci utilizzando i sistemi viventi come bioreattori è da allora largamente diffusa, diventando attualmente la via preferita di sintesi di numerosi farmaci, in particolare per il costo di produzione relativamente basso.

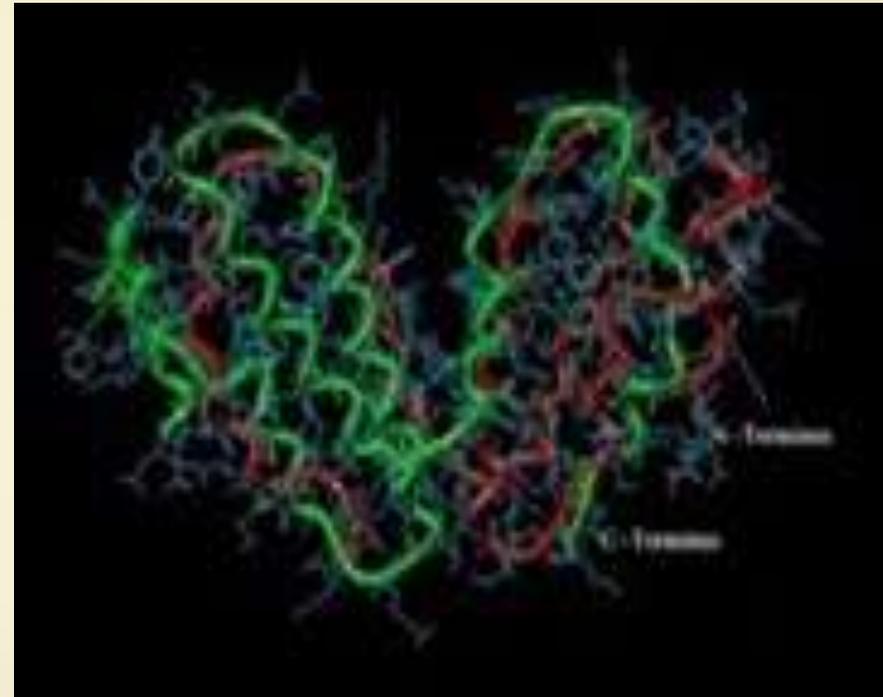
# I medicinali biotecnologici sono più grandi e complessi di quelli chimici

## Chimici



**Aspirina: Peso molecolare 180**

## Biotecnologici

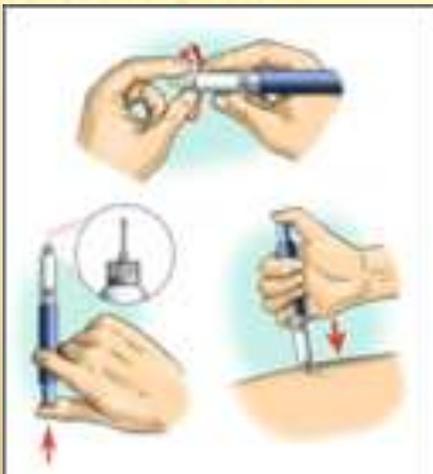


**Interferone beta: peso molecolare 19.000**

Farmaci "chimici"	Acido Acetilsalicilico	180
	Paracetamolo	151
	Simvastatina	419
Farmaci biotecnologici	Interferone-alfa	19.000
	Eritropoietina alfa	30.400
	Rituximab	145.000
	Trastuzumab	150.000

# I farmaci biotecnologici usati in medicina

Prodotto	Uso
Fattore di stimolazione delle colonie	Stimola la produzione di leucociti nei pazienti affetti da cancro o AIDS.
Eritropoietina	Previene l'anemia in pazienti sottoposti a dialisi renale e terapia tumorale.
Fattore VIII	Sostituisce il fattore della coagulazione mancante in pazienti con emofilia A.
Ormone della crescita	Sostituisce l'ormone naturale insufficiente in soggetti con crescita ridotta.
Insulina	Stimola l'ingresso del glucosio nelle cellule in soggetti affetti da diabete insulina-dipendente.
Fattore di crescita derivato dalle piastrine	Stimola la guarigione delle ferite.
Attivatore tissutale del plasminogeno	Dissolve i coaguli ematici dopo un infarto del miocardio o un ictus.
Vaccini: epatite B, herpes, influenza, meningite, pertosse	Impiegati nella prevenzione e nel trattamento di alcune malattie infettive.



# Altre categorie di farmaci prodotti mediante la tecnologia del DNA ricombinante

## Ormoni Polipeptidici

Peptidi o piccole proteine che svolgono funzioni essenziali nel controllo del metabolismo nei mammiferi.

Alcuni sono farmaci salvavita



Ormone della crescita:  
**Humatrope®**

Eritropoietina: regola la produzione di globuli rossi da parte del midollo osseo **Epocim®**



# Altre categorie di farmaci prodotti mediante la tecnologia del DNA ricombinante

## Immunomodulatori e Antitumorali

I più noti sono gli **INTERFERONI** che a seconda del tipo possono esplicare attività antivirale ( $\alpha$  e  $\beta$ ), immunomodulatrice ( $\gamma$ ) o antitumorale ( $\alpha$ ).



**Interferone  $\beta$** : usato nel trattamento della SM, agisce sui linfociti T inibendone la migrazione e riduce la produzione di citochine. **Avonex<sup>®</sup>**, **Betaferon<sup>®</sup>**, **Rebif<sup>®</sup>**



**Interferone  $\alpha$** : usato nel trattamento di cancro al rene, melanoma, alcune forme di linfoma e leucemie.

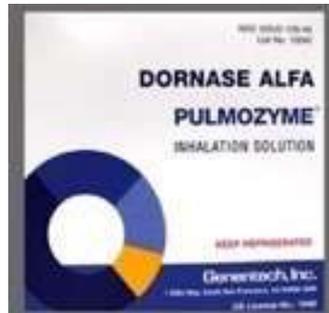
**IntronA<sup>®</sup>**, **Infergen<sup>®</sup>**, **Alfaferone<sup>®</sup>**, **Roferon-A<sup>®</sup>**

**Interferone  $\gamma$** : usato per ridurre l'incidenza di infezioni in pazienti con ridotte difese immunitarie.

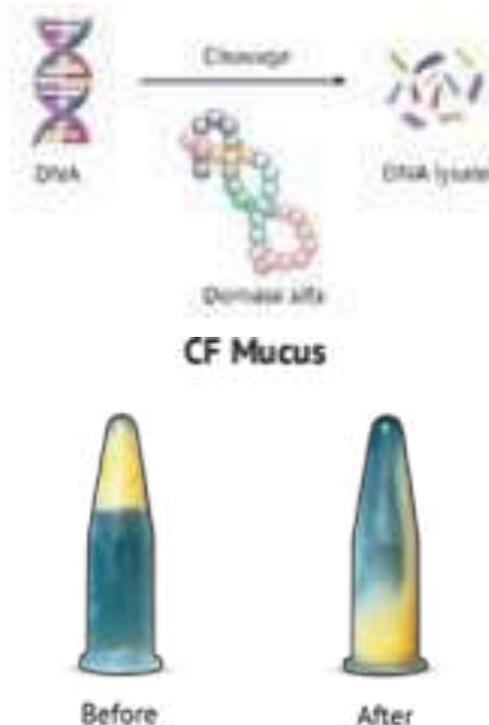
**Imukin<sup>®</sup>**



## DNASE-DRONASE ALFA (PULMOZYME)



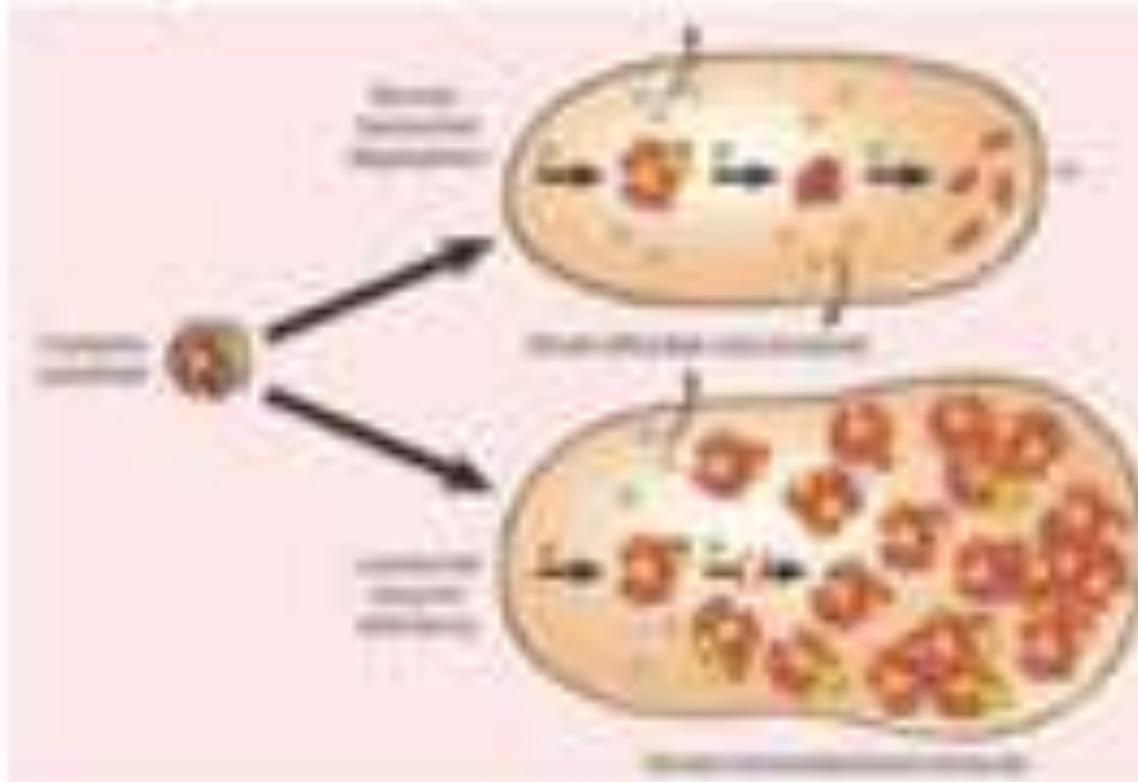
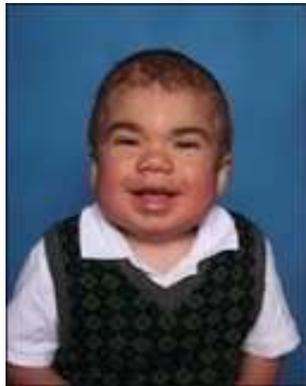
Farmaco impiegato nel trattamento della FIBROSI CISTICA. Il dornase alfa idrolizza il DNA presente nell'espettorato e nel muco delle vie aeree e ne riduce la viscosità a livello del polmone. La ritenzione di secrezioni viscoso purulente nelle vie respiratorie riduce la funzionalità polmonare ed esacerba le infezioni. Le secrezioni purulente contengono elevatissime concentrazioni di DNA extracellulare, liberato nel processo di degenerazione dei leucociti che si accumulano in risposta all'infezione.



Somministrato per via inalatoria (ampolle monodose 2.5 mL) non ha effetto sul DNA intracellulare.

## ENZIMI PER IL TRATTAMENTO DI MALATTIE DA ACCUMULO LISOSOMIALE

Le malattie da accumulo lisosomiale o (LSD) ecorrono dall'inglese Lysosomal Storage Disease sono un'eterogenea famiglia di patologie, circa 50, dovute a diversi tipi di difetti genetici, accomunate dalla caratteristica di determinare un accumulo di metaboliti o sostanze nei lisosomi con conseguente perdita di funzionalità cellulare. Le cause di queste patologie sono sempre da ricondurre ad un'anomalia genetica.



### Gaucher Disease: Clinical Signs and Symptoms

\* In neuroopathic subtypes only

- Respiratory**
  - Progressive respiratory muscle weakness
  - Recurrent respiratory infections
- Musculoskeletal**
  - Progressive muscle weakness
  - Postural hypotonia / "hunched body" / "hunched baby"
- Cardiac**
  - Cardiomegaly
  - Progressive cardiomyopathy
- Gastrointestinal**
  - Nausea/vomiting
  - Feeding difficulties

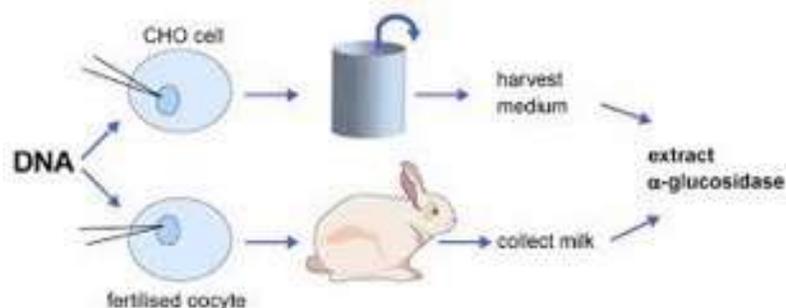
1. Imiglucerasio (Cerezyme) → malattia di Gaucher
2. Aglucerasio alfa (Mylzyme, Lumizyme) → malattia di Pompe
3. Mulsifasio (Imzyme) → sindrome di Hunter

## TERAPIA ENZIMATICA DELLA MALATTIA DI POMPE

### ALGLUCOSIDASE ALFA (MYOZYME, LUMAZYME)



- Myozyme si presenta sotto forma di polvere per la preparazione di una soluzione per infusione endovenosa.
- Ha dimostrato di aumentare significativamente la sopravvivenza di soggetti affetti da malattia di Pompe. L'88% dei pazienti trattati col Myozyme è sopravvissuto ed ha raggiunto l'autonomia respiratoria a 18 mesi di età, in confronto al 2% dei pazienti del gruppo storico.
- Ha ridotto il bisogno di ventilazione assistita.
- Migliora la capacità motoria e determina progressi nelle funzioni cardiache insieme a miglioramenti e stabilizzazione dei parametri di crescita.
- Più precocemente viene diagnosticata la malattia e iniziato il trattamento ai piccoli pazienti, migliori sono i risultati osservati.



# Gli anticorpi in Biotecnologie



Gli anticorpi  
in realtà  
sono fatti così...



...ma li rappresentiamo  
solitamente  
in questo modo

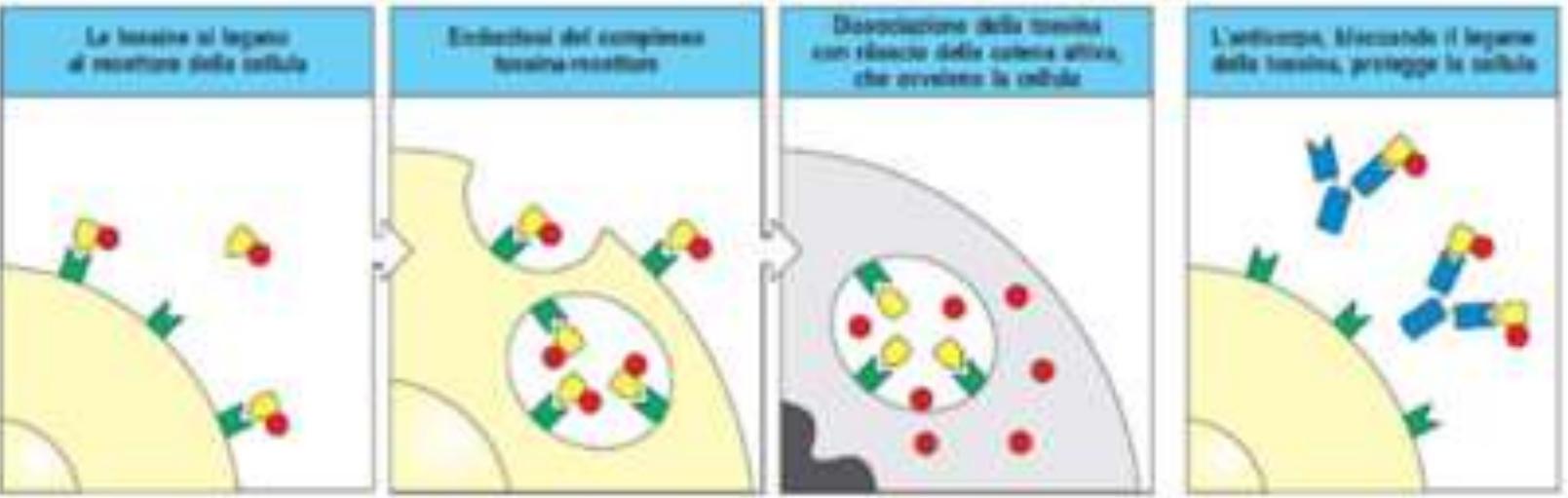
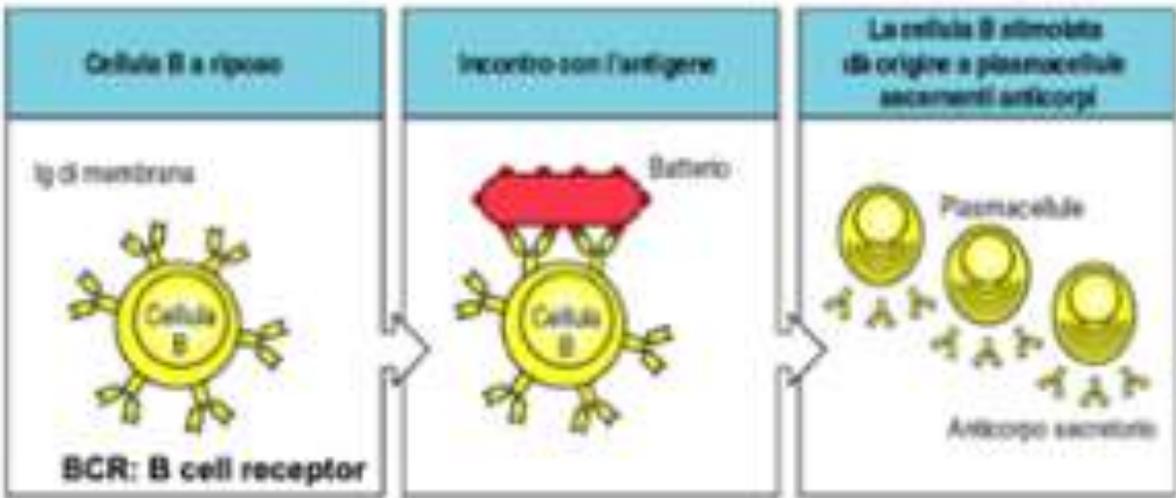


Sono composti  
da quattro blocchi...

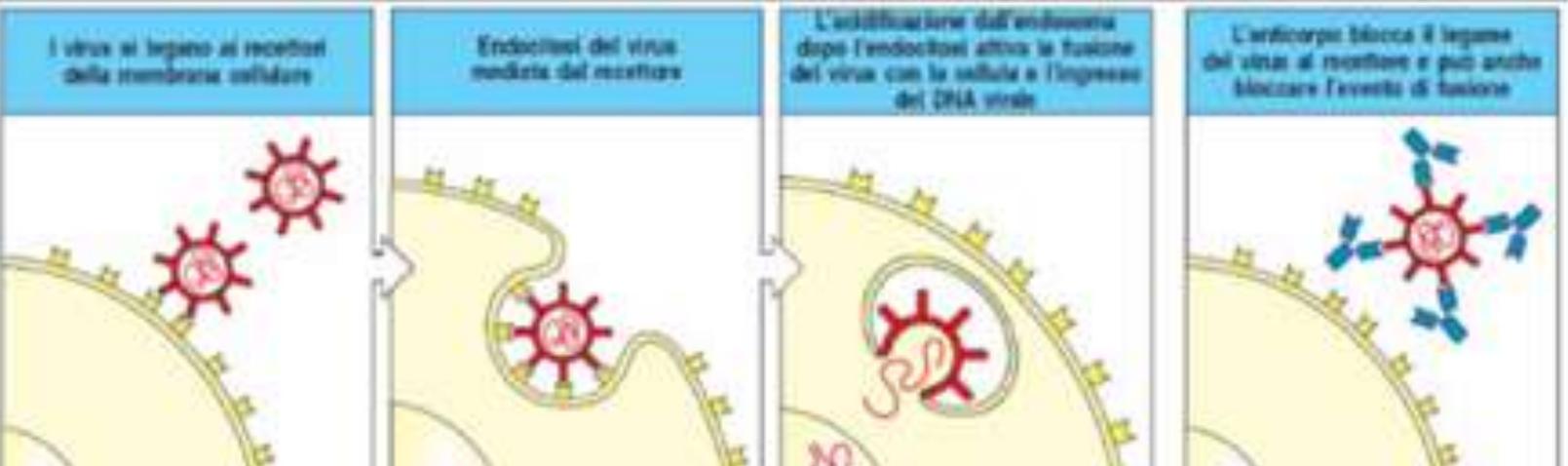


...e due tipi  
di regioni

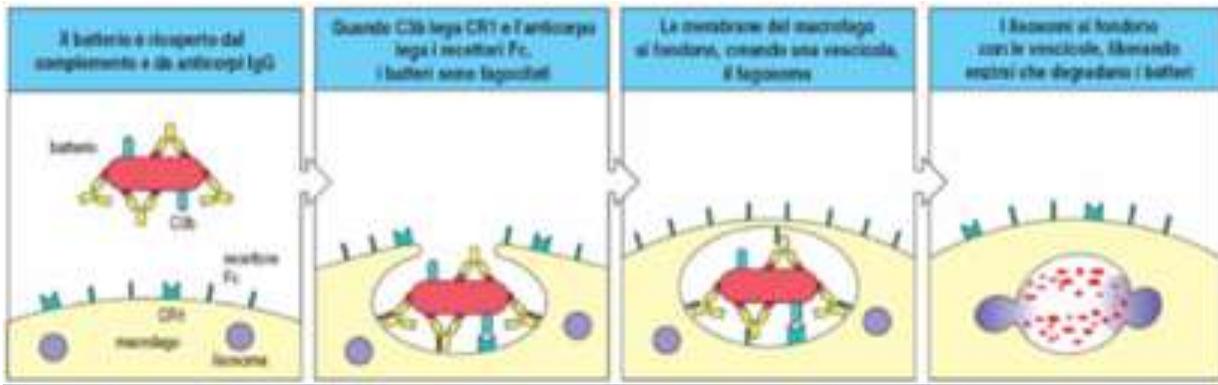
Produzione



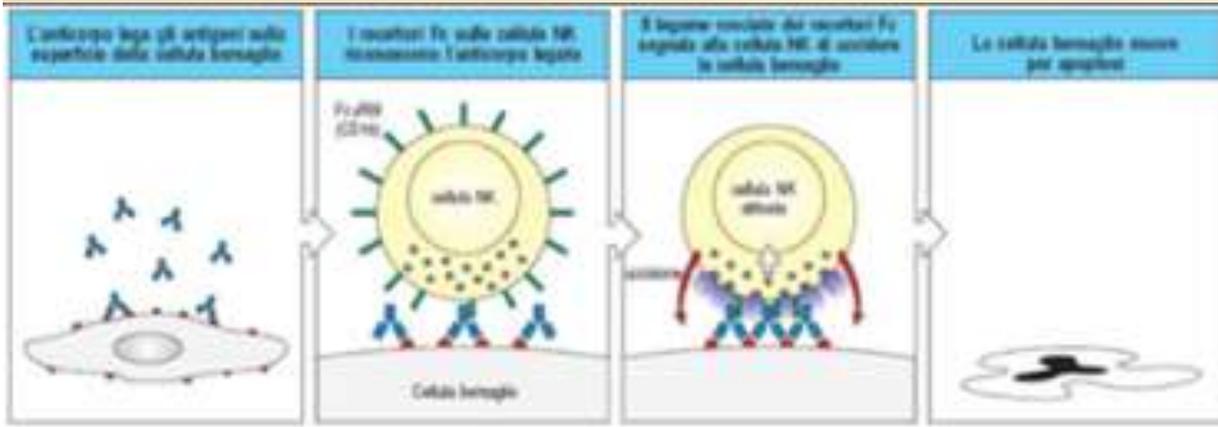
Inattivano le tossine batteriche



Impediscono l'ingresso in cellula di virus e batteri



Fagocitosi batterica



Eliminazione di cellule tumorali

# Anticorpi monoclonali (Mab) e terapia antineoplastica



Nobel Prize Award in Medicine and Physiology in 1984

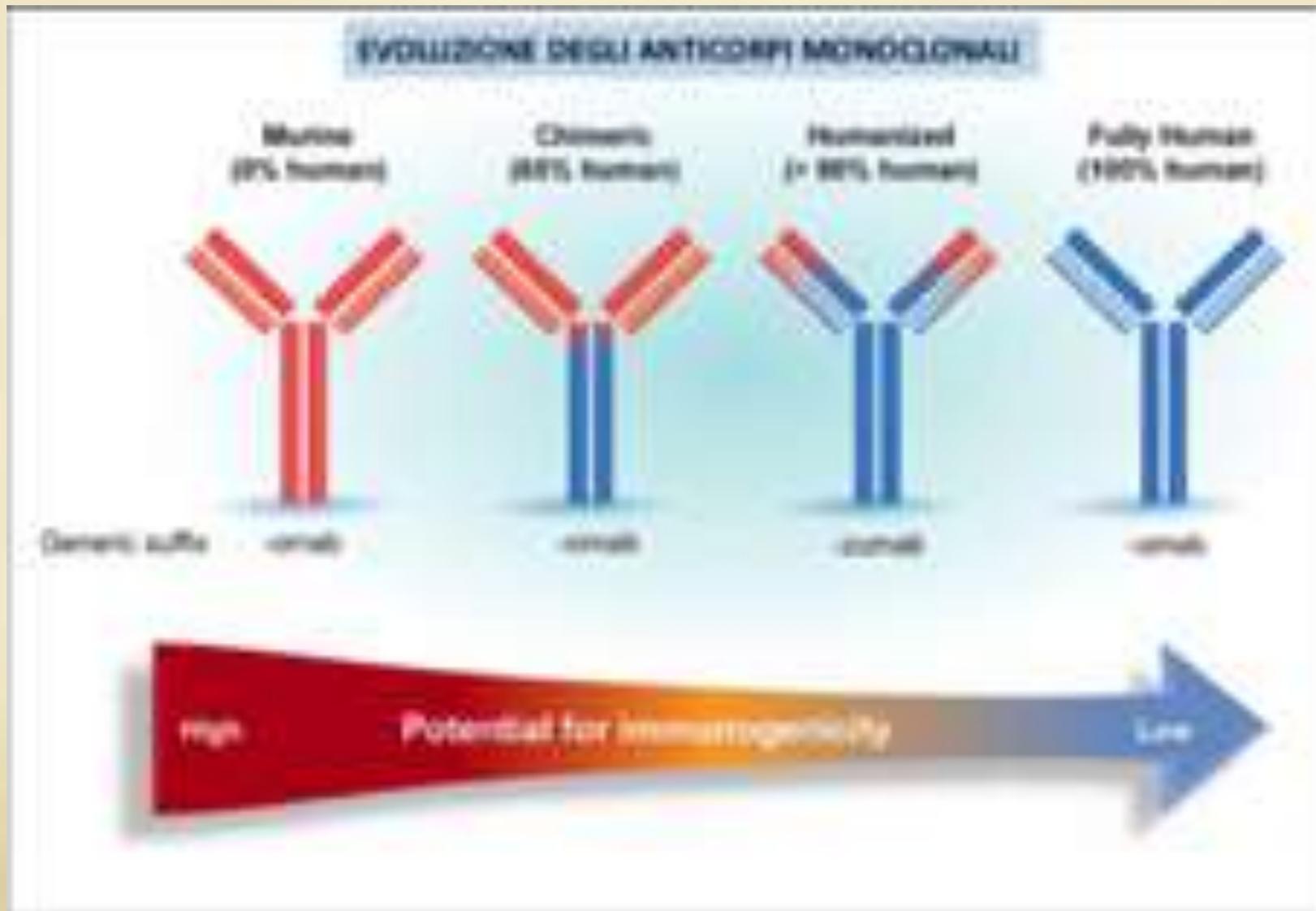
Prof. César Milstein  
Prof. Georges Köhler

Tuttavia i linfociti B coltivati in vitro, muoiono dopo brevissimo tempo.

La scoperta degli anticorpi monoclonali (mAb) risale al 1975, quando 2 ricercatori César Milstein e Georges Köhler (che nel 1984 vinsero il premio Nobel per la medicina) misero a punto la tecnica per la sintesi degli anticorpi monoclonali.

The image shows a slide with a background of a Nobel Prize award announcement. It features three black and white portraits of men. A yellow box with a blue arrow pointing down contains the text 'Tuttavia i linfociti B coltivati in vitro, muoiono dopo brevissimo tempo.' Below the portraits, there is a blue curved arrow pointing to the right. At the bottom, there is a paragraph of text in Italian.

# Anticorpi monoclonali (Mab) e terapia antineoplastica



# Anticorpi monoclonali (Mab) e terapia antineoplastica

## EVOLUZIONE DEGLI ANTICORPI MONOCLONALI

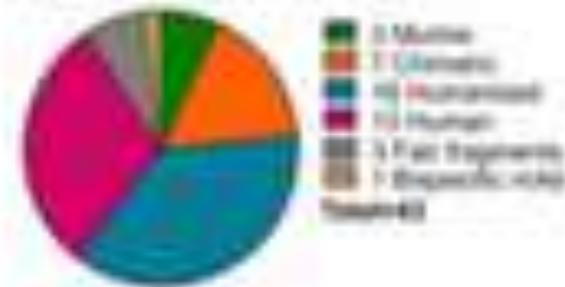
La maggior parte degli anticorpi monoclonali in commercio sono umanizzati o totalmente umani



- Non inducono una risposta immunitaria
- Mostrano un'emivita più lunga (23 giorni contro le 24 ore dei murini)
- Si ha adeguato riconoscimento del dominio Fc da parte dei meccanismi effettori umani

C

Licensed therapeutic antibodies classified by type of antibody



# Anticorpi monoclonali (Mab) e terapia antineoplastica

## ANTICORPI MONOCLONALI: MECCANISMO D'AZIONE ANTITUMORALE

In base al meccanismo d'azione possono essere classificati in

**ANTICORPI MONOCLONALI NUDE** : agiscono direttamente le cellule neoplastiche.

**ANTICORPI MONOCLONALI CONIUGATI**

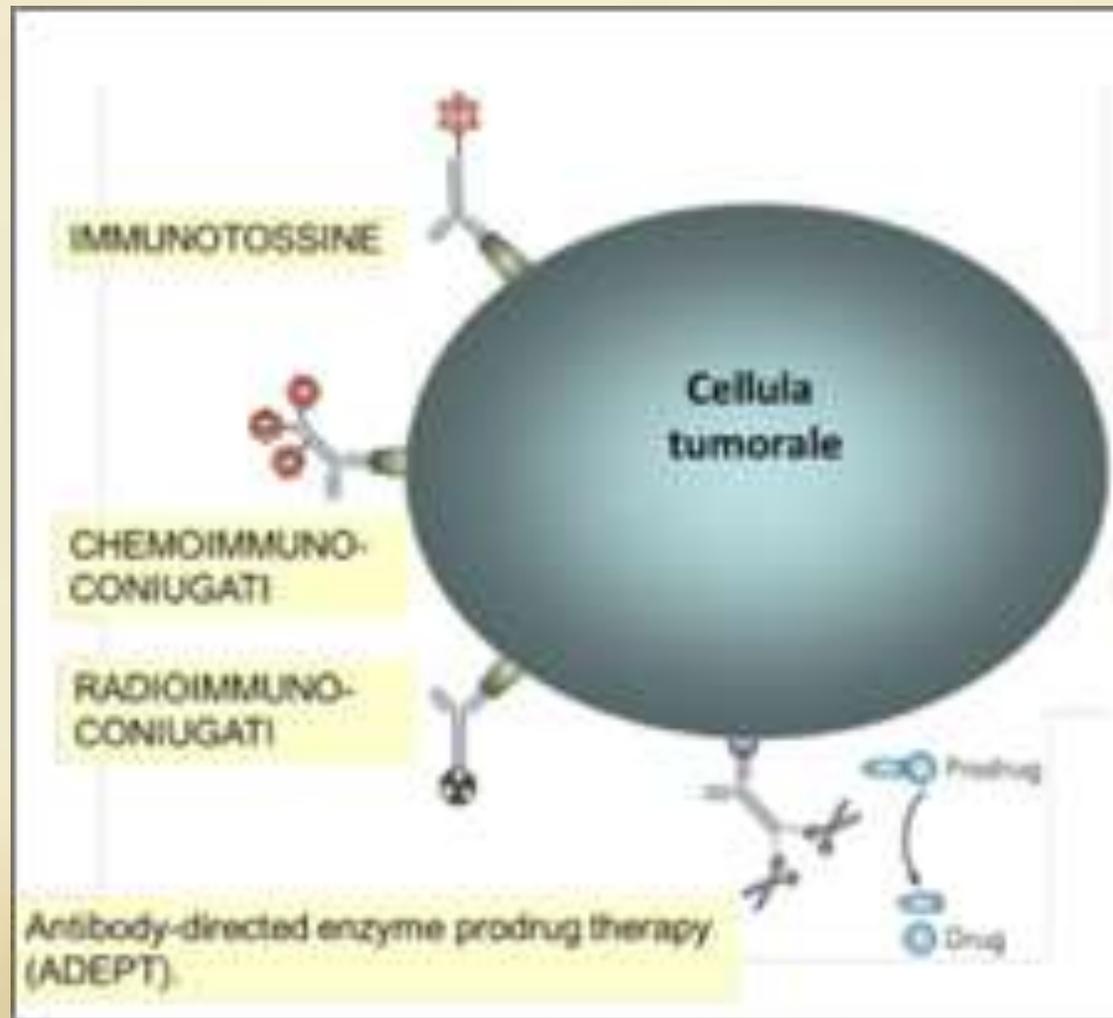
Serum

• Sostanze Radioattive

• Farmaci

• Enzimi attivatori di un profarmaco

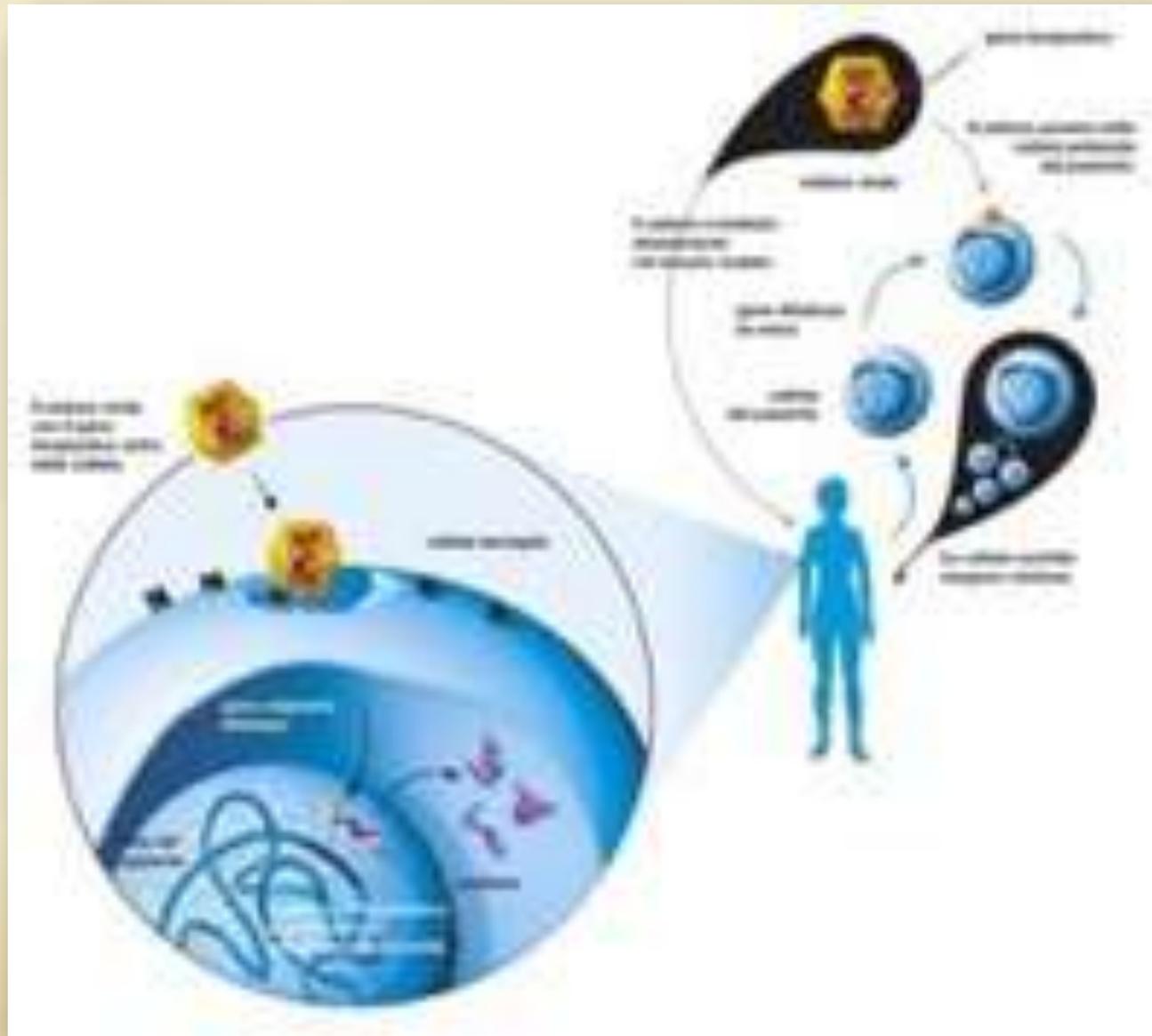
# Anticorpi monoclonali (Mab) e terapia antineoplastica







# La Terapia Genica



# Quali sono i principali VANTAGGI PER L'UOMO?

1. Le biotecnologie consentono di proteggere in maniera più efficace la nostra salute
2. nuovi farmaci sviluppati: vaccini più sicuri, medicinali contro disfunzioni metaboliche a base genetica,
3. trattamenti contro diverse forme di epatite,
4. antitumorali più efficaci e meno dannosi per l'organismo,
5. stimolatori delle difese immunitarie in caso di loro abbassamento e regolatori delle stesse in caso di funzionamento eccessivo.

# L'ingegneria tissutale

1) Sostenere l'invecchiamento della popolazione

- Organi e tessuti diventano inefficienti e le disponibilità di trapianto sono insufficienti.
- Organi e tessuti servono durante operazioni chirurgiche, traumi, malattie come il diabete.

2) Curare alcune situazioni patologiche che non sono risolvibile farmacologicamente

3) Creare tessuti per Test *In vitro* di tossicità (sostituire i test su animali es. pelle e cornea)



# Gli elementi di base per la rigenerazione dei tessuti



LE CELLULE: adulte o STAMINALI

LO SCAFFOLD (impalcatura): tridimensionale e poroso, accoglie le cellule ed agisce come supporto meccanico

IL CONDIZIONAMENTO biochimico e fisico: assicurato all'interno del bioreattore e finalizzato ad ottenere un tessuto più simile possibile a quello naturale.

# Tessuti Ingegnerizzati

- ✓ Pelle  
Il primo tessuto ingegnerizzato introdotto in commercio
- ✓ Cartilagine
- ✓ Osso
- ✓ Pancreas
- ✓ Vasi sanguigni
- ✓ Fegato
- ✓ Valvole cardiache
- ✓ Vescica urinaria
- ✓ .....



# Pelle Ingegnerizzata: quando serve?

## GRANDI USTIONI



Ogni danno alla cute di estensione superiore ai 4 cm<sup>2</sup> di superficie non si rigenera spontaneamente in modo spontaneo, se non con formazione di **tessuto cicatriziale !!!!**

## ULCERA DIABETICA

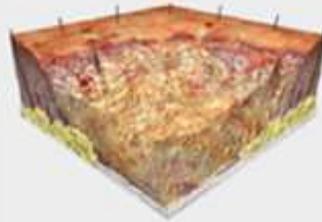
*(estensione limitata ma difficili da guarire)*



# Pelle Ingegnerizzata: cura delle ustioni

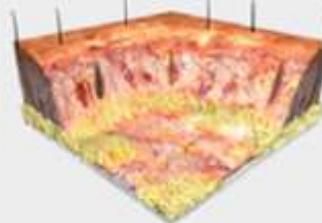
## DAY 0: PRE-TREATMENT

Patients must have accurate diagnosis and treatment of underlying disease and risks. There must be thorough pre-operative control of inflammation, ulceration, debris and bioburden, and edema (as best as the disease and available treatments permit).



## DAY 1: DEBRIDEMENT

Prepare wound bed using standard methods to ensure wound is free of debris and necrotic tissue. Regardless of how well the wound has been prepared and how healthy it looks, INTEGRA™ Matrix Wound Dressing must not be placed on an existing wound surface. The entire existing wound must be completely excised or surgically debrided to ensure the wound bed and edges contain viable tissue.



## DAY 1: APPLICATION

INTEGRA™ Matrix Wound Dressing is applied to the excised wound bed (A). Thump results for proper adhesion of application, affixing it to the wound. The INTEGRA Matrix conforms to and covers the wound surface. It can be affixed with sutures, staples, or any suitable adhesive.

The deeper wounds INTEGRA™ Matrix Wound Dressing (B) can be used in combination (C) with INTEGRA™ Strips Matrix Wound Dressing.



## DAY 7-14: NEW DERMIS FORMATION

Several cells begin migrating into the matrix and establish a new molecular network. At healing completion, the collagen network of the INTEGRA Formable is replaced by collagen synthesized produced by new dermal fibroblasts.



## DAY 21+: SILICONE REMOVAL

Upper formation of a new dermis occurs; the INTEGRA silicone layer is removed. The INTEGRA collagen network is degraded and is absorbed into the body during the debridement.



## DAY 21+: EPIDERMAL AUTOGRAFT

A 1- to 2-mm - 2.000 to 2.000 - 0.125 mm-thickness epidermal autograft is applied over the new dermis.



## DAY 25-30: REGENERATED SKIN

Successful regeneration completes the process, yielding a permanent and lasting area of tissue.



# Pelle Ingegnerizzata: l'ulcera diabetica

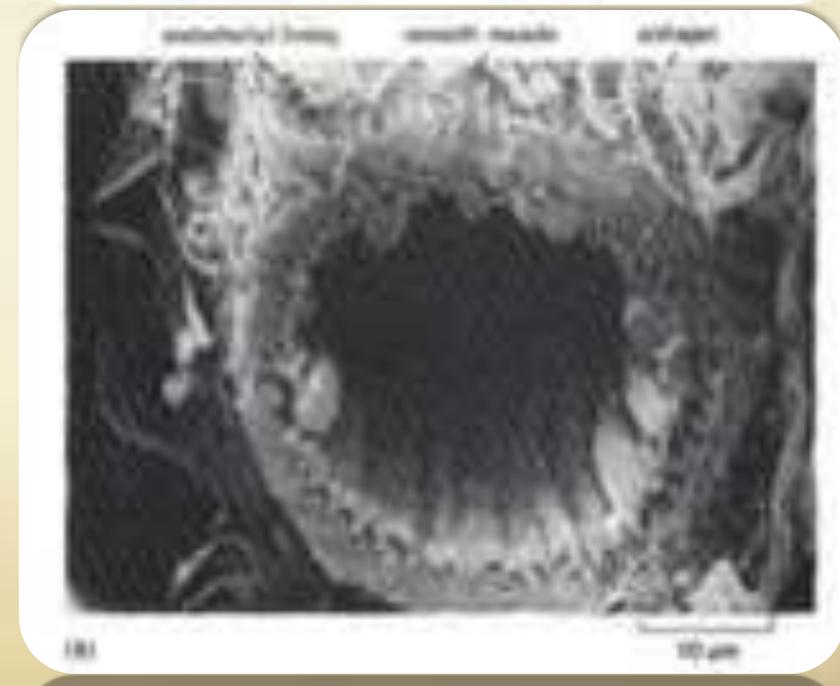
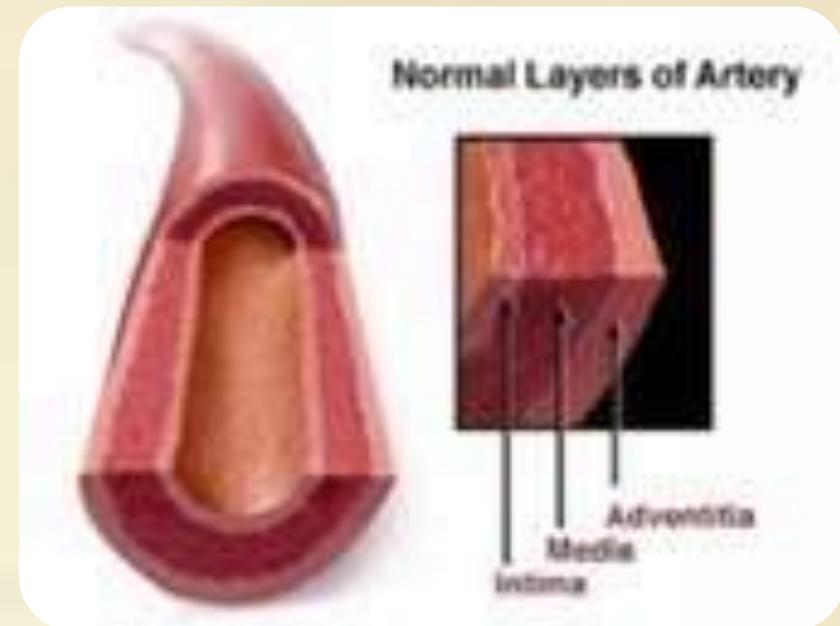


# Vasi sanguigni

- **FUNZIONE:** Trasporto dell'ossigeno, dell'anidride carbonica, dei nutrienti e prodotti del catabolismo, cellule del sistema immunitario e di altri sistemi, messaggeri chimici (ormoni).
- Proprietà meccaniche (resistenza alla rottura ed elasticità)

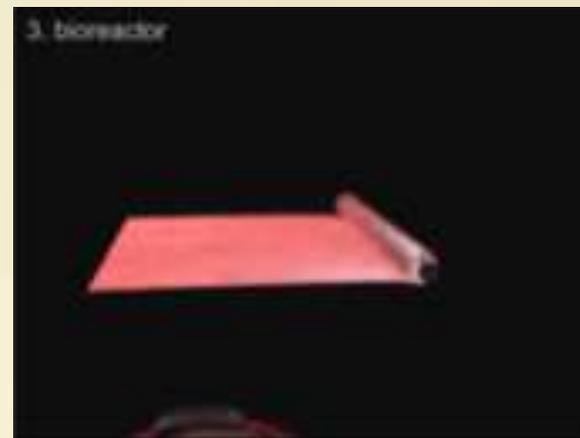
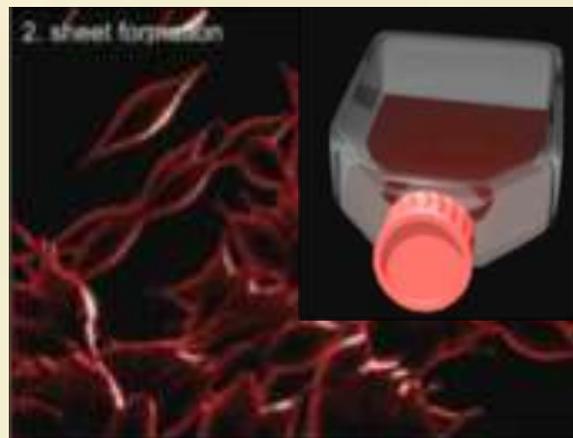
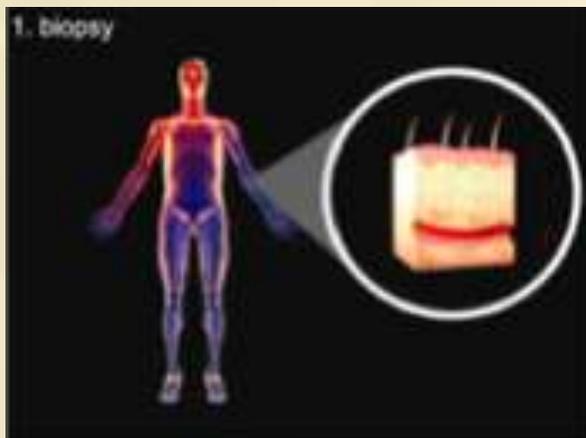
## ORGANIZZAZIONE:

- ✓ **Intima:** cellule endoteliali + lamina basale (collagene IV ed elastina). Mantengono il vaso libero da coaguli.
- ✓ **Media:** cellule muscolari lisce
- ✓ **Avventizia:** tessuto connettivo, fibroblasti, vasa vasorum





# Vasi sanguigni ingegnerizzati



Grazie per l'attenzione! 😊

