

A microscopic view of cells, showing various structures and organelles, serving as a background for the title.

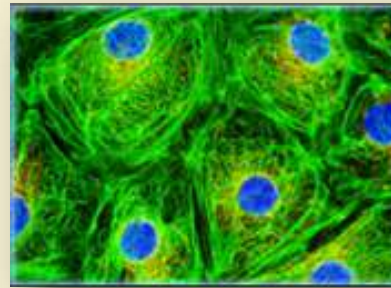
Le Biotecnologie e la Salute Umana

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



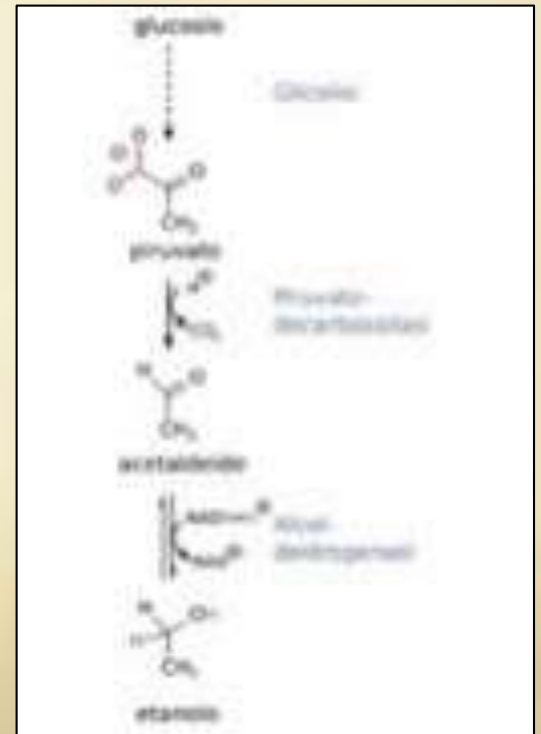
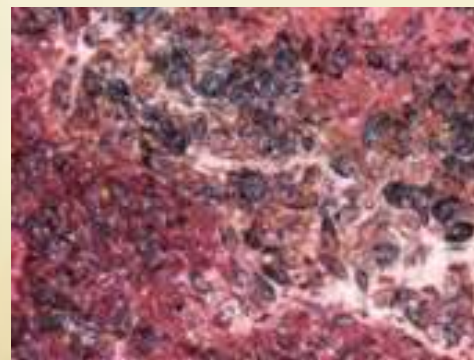
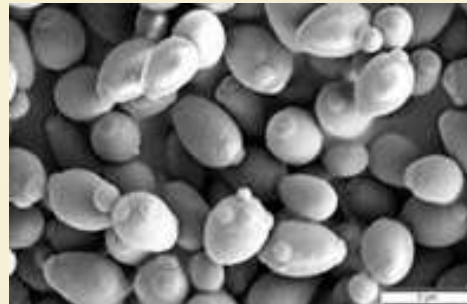
Le biotecnologie: scienze antiche

- 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.

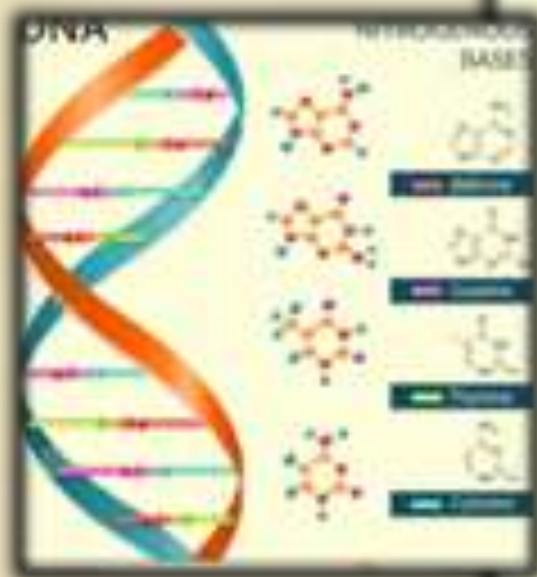


Le biotecnologie: scienze antiche

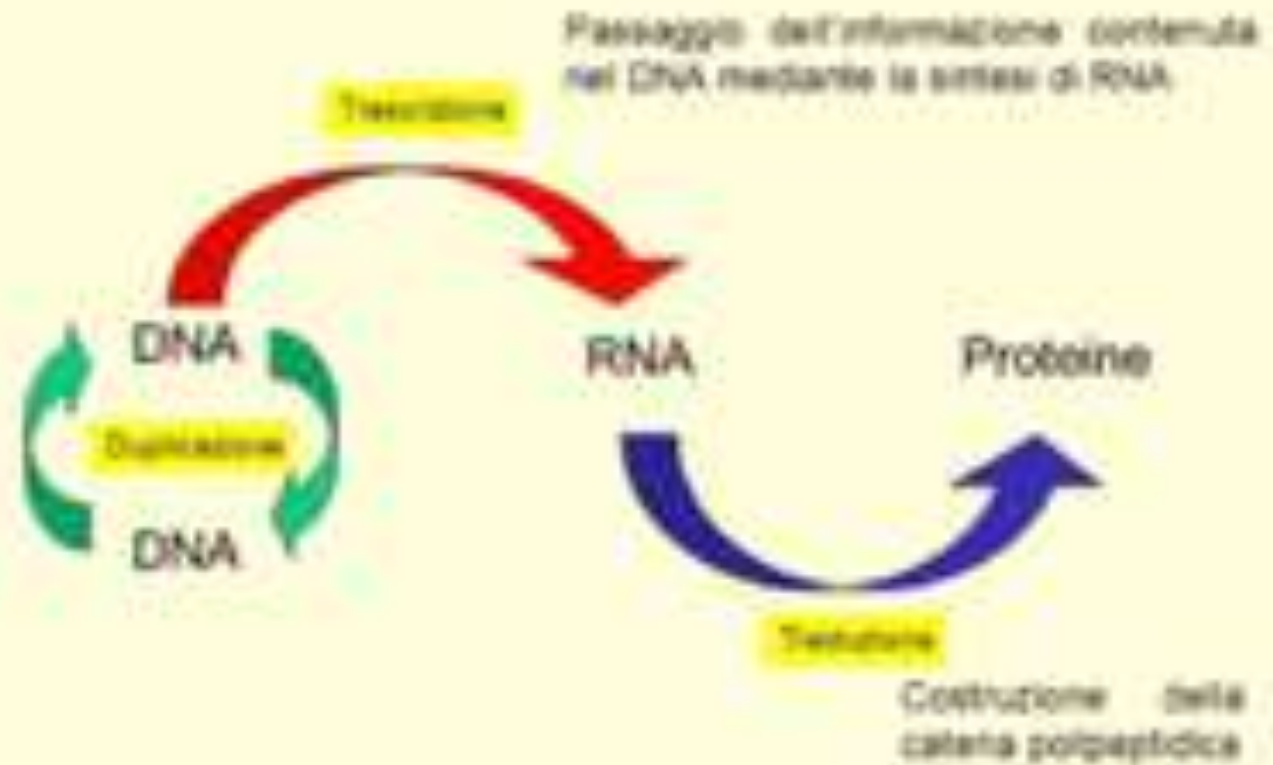
- La lievitazione del pane, la produzione di birra, formaggi e yogurt sono processi biotecnologici che utilizzano microrganismi o enzimi presenti in natura per trasformare materie prime alimentari in prodotti più gradevoli al palato, più digeribili e più facilmente conservabili.



Le moderne biotecnologie



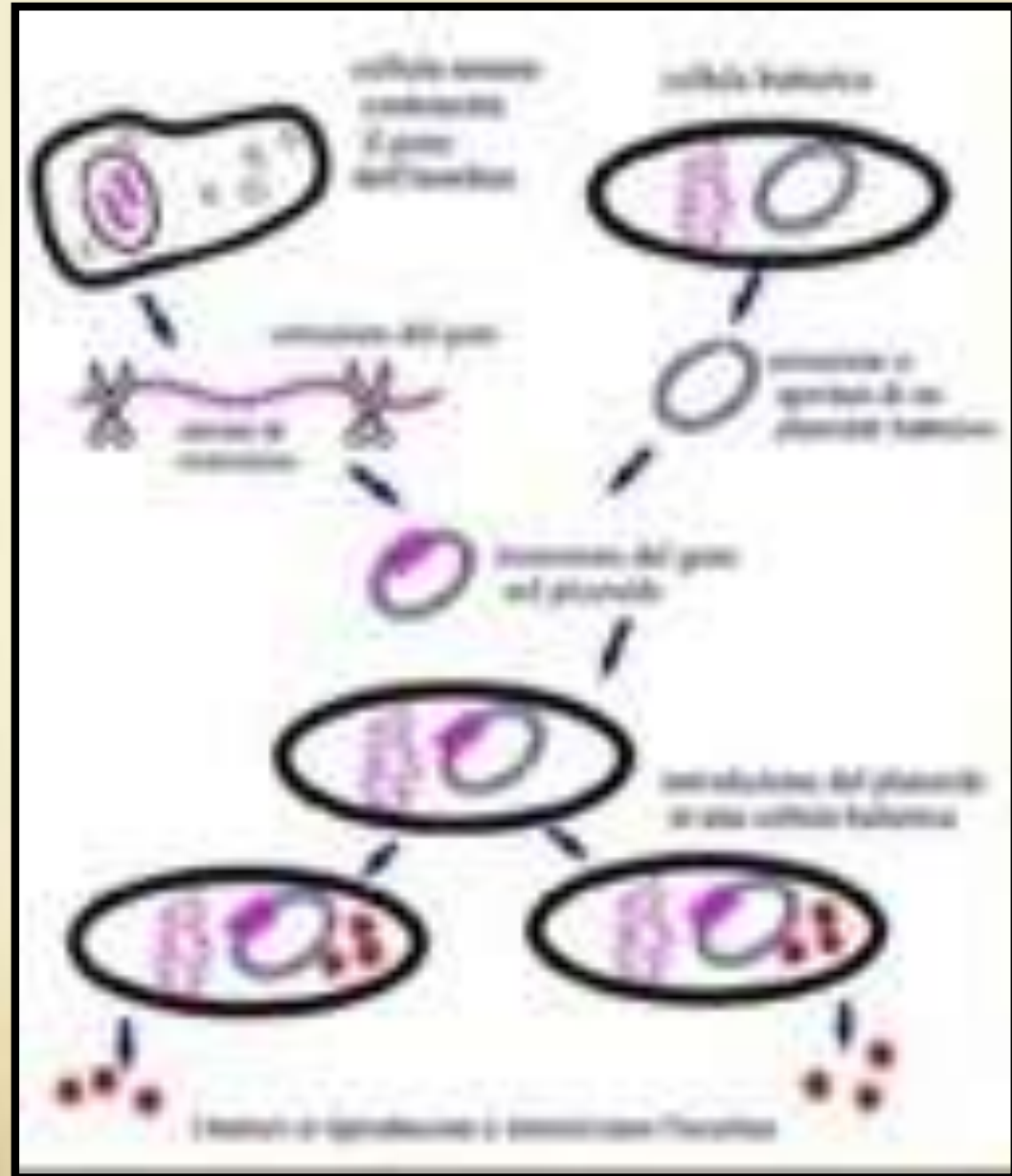
IL "DOGMA CENTRALE" DELLA BIOLOGIA



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*)

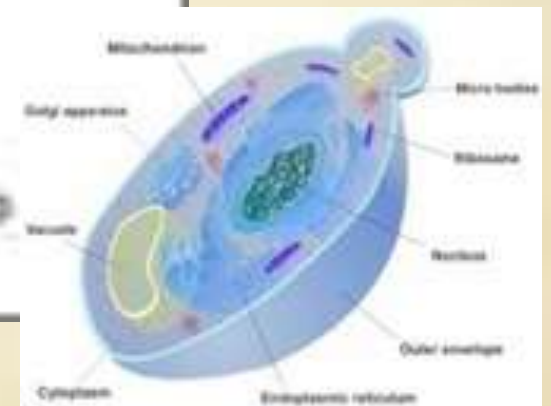
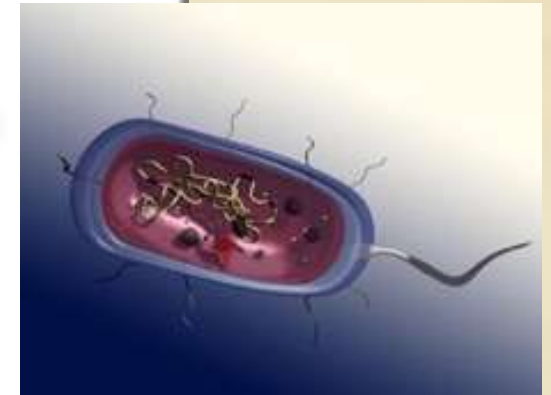
I microrganismi sono facilmente manipolabili, economici, modificabili in tempi rapidi. Tuttavia, le proteine prodotte nei batteri sono prive di modificazioni post-traduzionali. Spesso offrono proteine denaturate che necessitano di refolding. Problemi con proteine multimeriche e contenenti ponti disolfuro.



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.



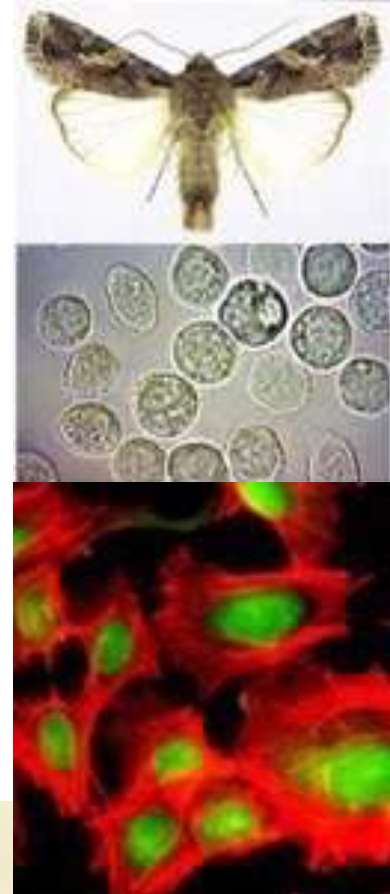
SISTEMI DI ESPRESSIONE PER LA PRODUZIONE DI PROTEINE RICOMBINANTI

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.

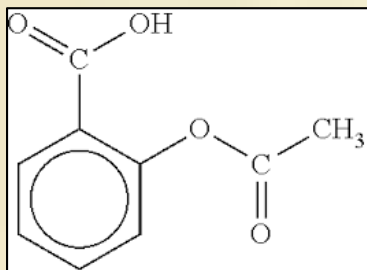


La struttura dell'insulina, ingegnerizzata e prodotta in laboratorio.

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

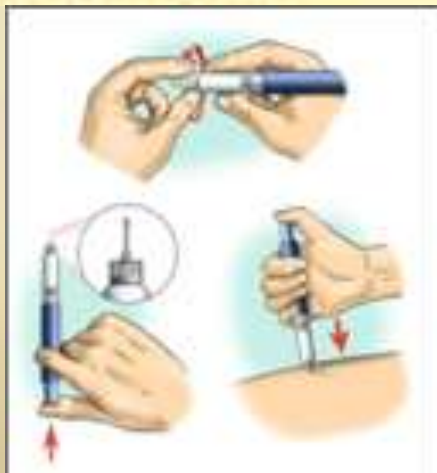


Interferone beta: peso molecolare 19.000

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

Proteine del sangue

Proteine o fattori coinvolti nei processi della coagulazione del sangue (fattori VII, VIII, IX) sia nei processi che degradano i coaguli (TPA)

Si sono eliminati i rischi associati alla potenziale contaminazione da parte di agenti virali (HIV, HBV, HCV)



Fattore VIII: **Recombine**®



TPA: **Activase**®

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 (α e β), immunomodulatrice (γ) o antitumorale (α).



Interferone β : usato nel trattamento della SM, agisce sui linfociti T inibendone la migrazione e riduce la produzione di citochine. **Avonex[®]**, **Betaferon[®]**, **Rebif[®]**



Interferone α : usato nel trattamento di cancro al rene, melanoma, alcune forme di linfoma e leucemie.

IntronA[®], **Infergen[®]**, **Alfaferone[®]**, **Roferon-A[®]**

Interferone γ : usato per ridurre l'incidenza di infezioni in pazienti con ridotte difese immunitarie.

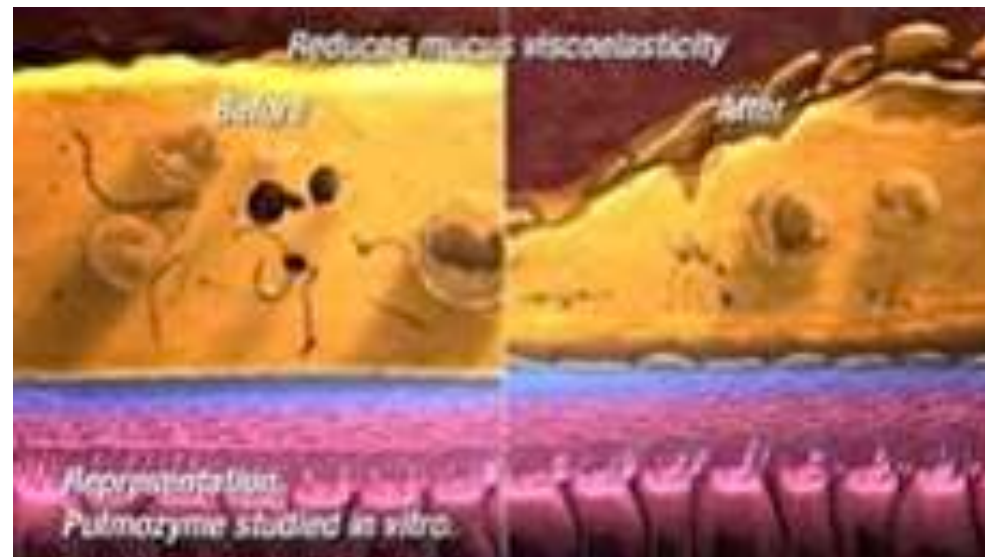
Imukin[®]



DNASE-DRONASE ALFA (PULMOZYME)



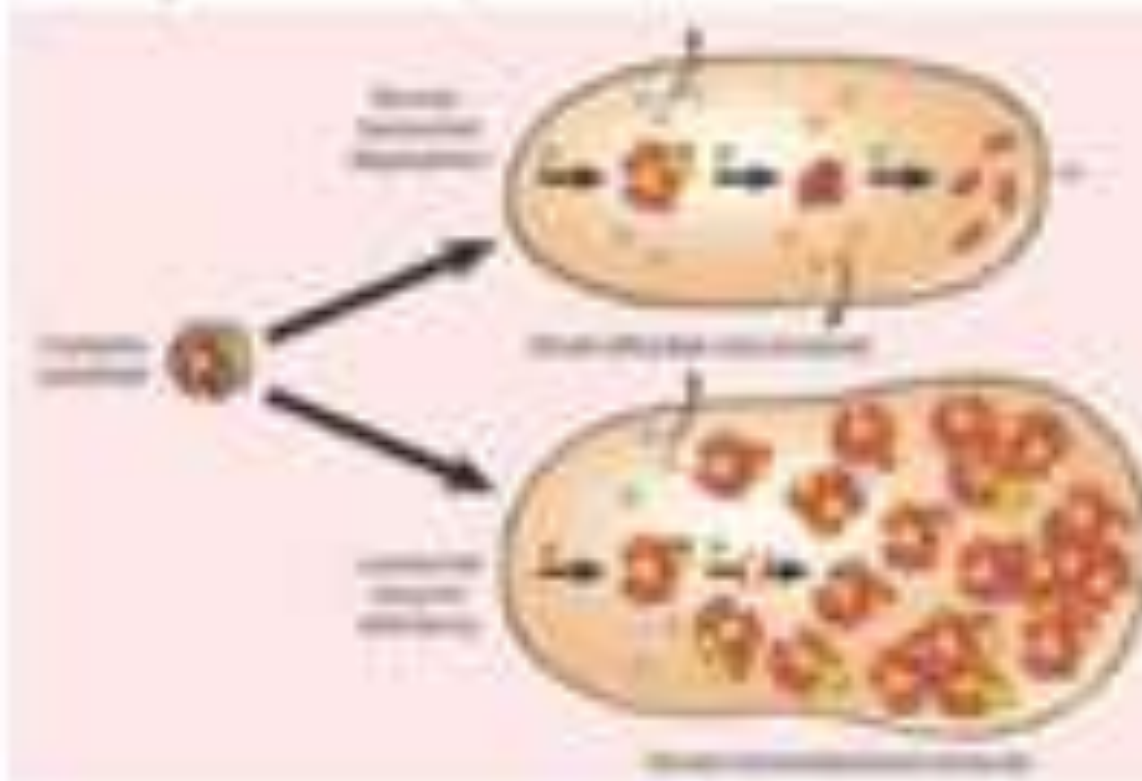
Farmaco impiegato nel trattamento della FIBROSI CISTICA. Il dornase alfa idrolizza il DNA presente nell'espettorato e nel muco delle vie aeree e ne riduce la viscosità a livello del polmone. La ritenzione di secrezioni viscoso purulente nelle vie respiratorie riduce la funzionalità polmonare ed esacerba 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) derivate 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
 - Profound hypotonia / "floppy baby"
- Cardiac**
 - Cardiomegaly
 - Progressive cardiomyopathy
- Gastrointestinal**
 - Nausea/vomiting
 - Feeding difficulties

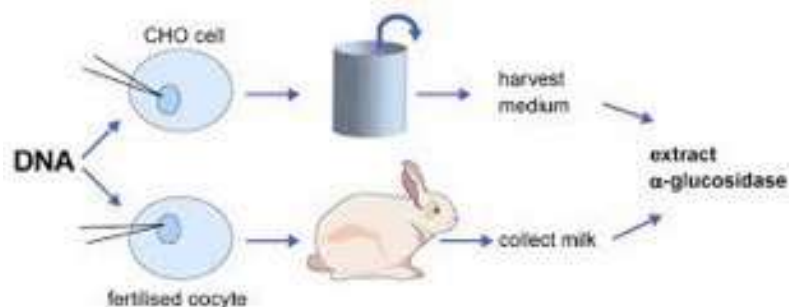
1. Imiglucerasa (Cerezyme) → malattia di Gaucher
2. Aglucerasa alfa (Mylzyme, Lumizyme) → malattia di Pompe
3. Mulsifase (Lumizyme) → sindrome di Hunter

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

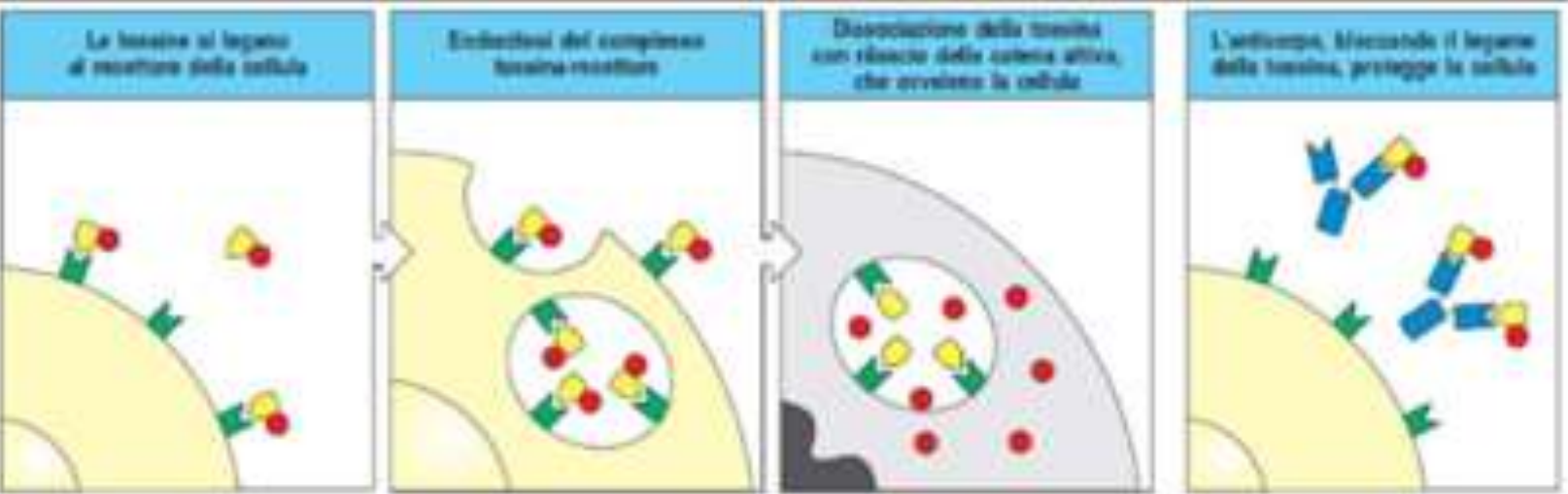
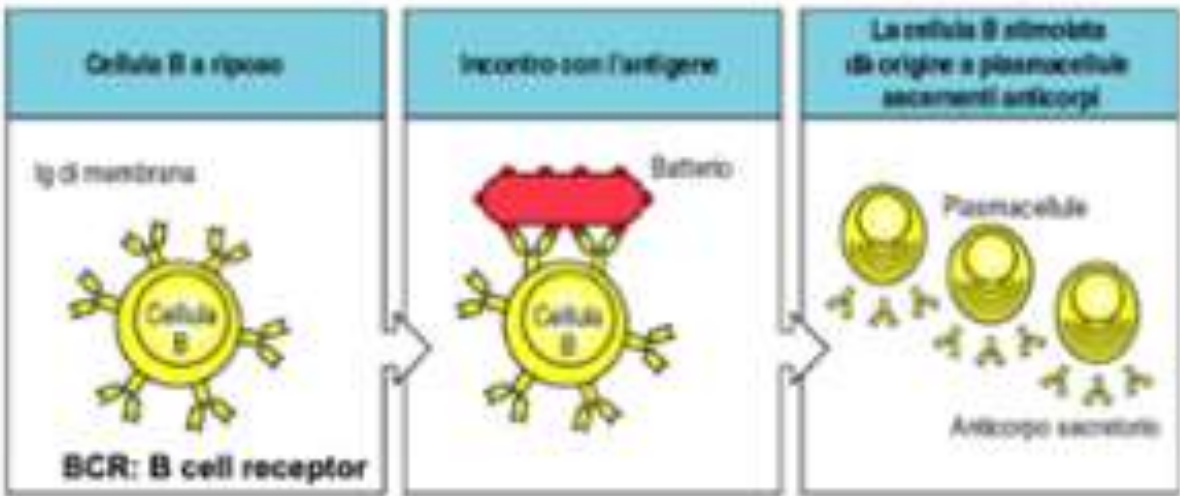


Sono composti
da quattro blocchi...

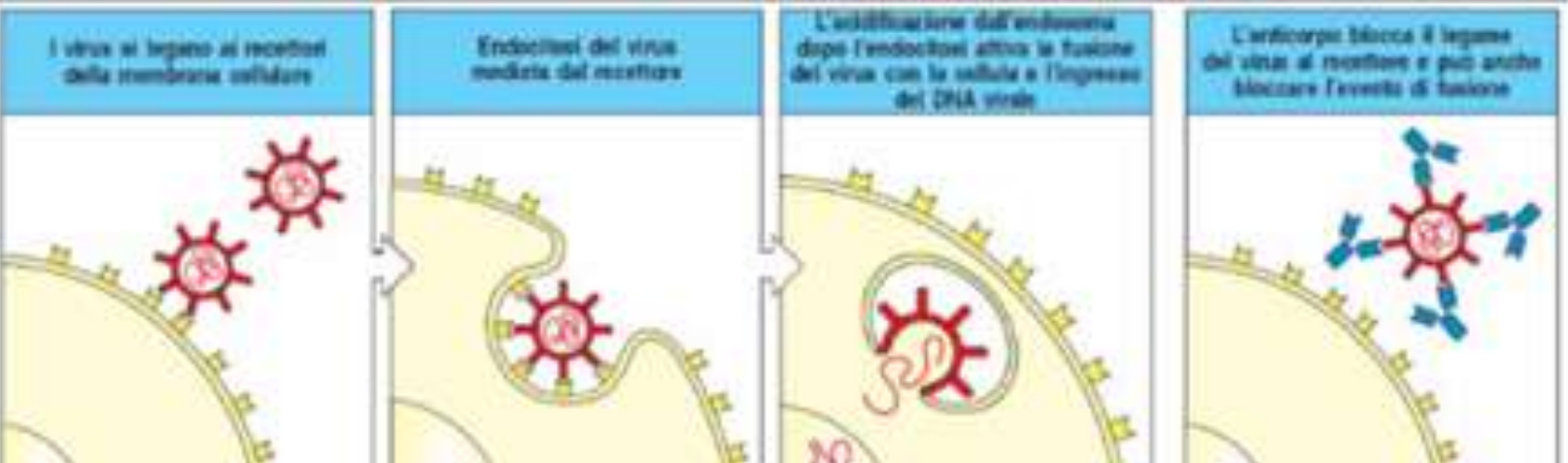


...e due tipi
di regioni

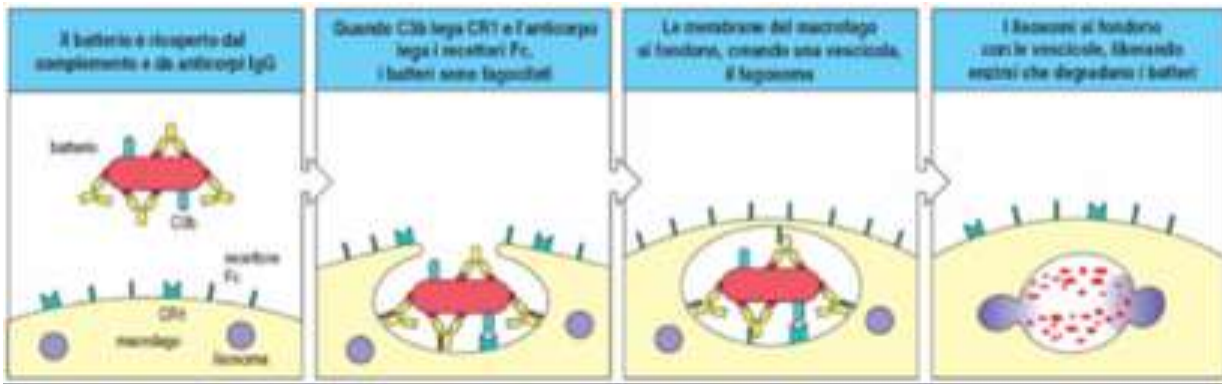
Produzione



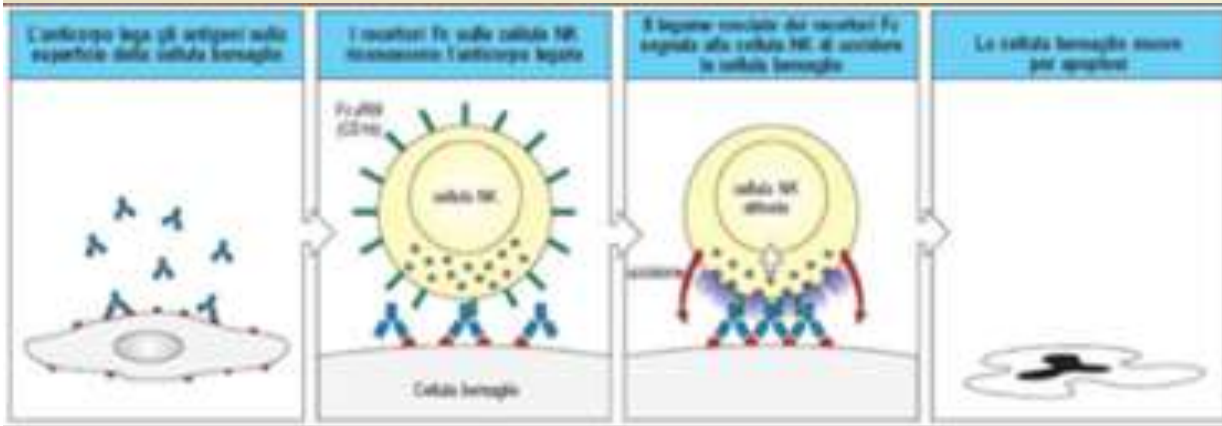
Inattivano le tossine batteriche



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

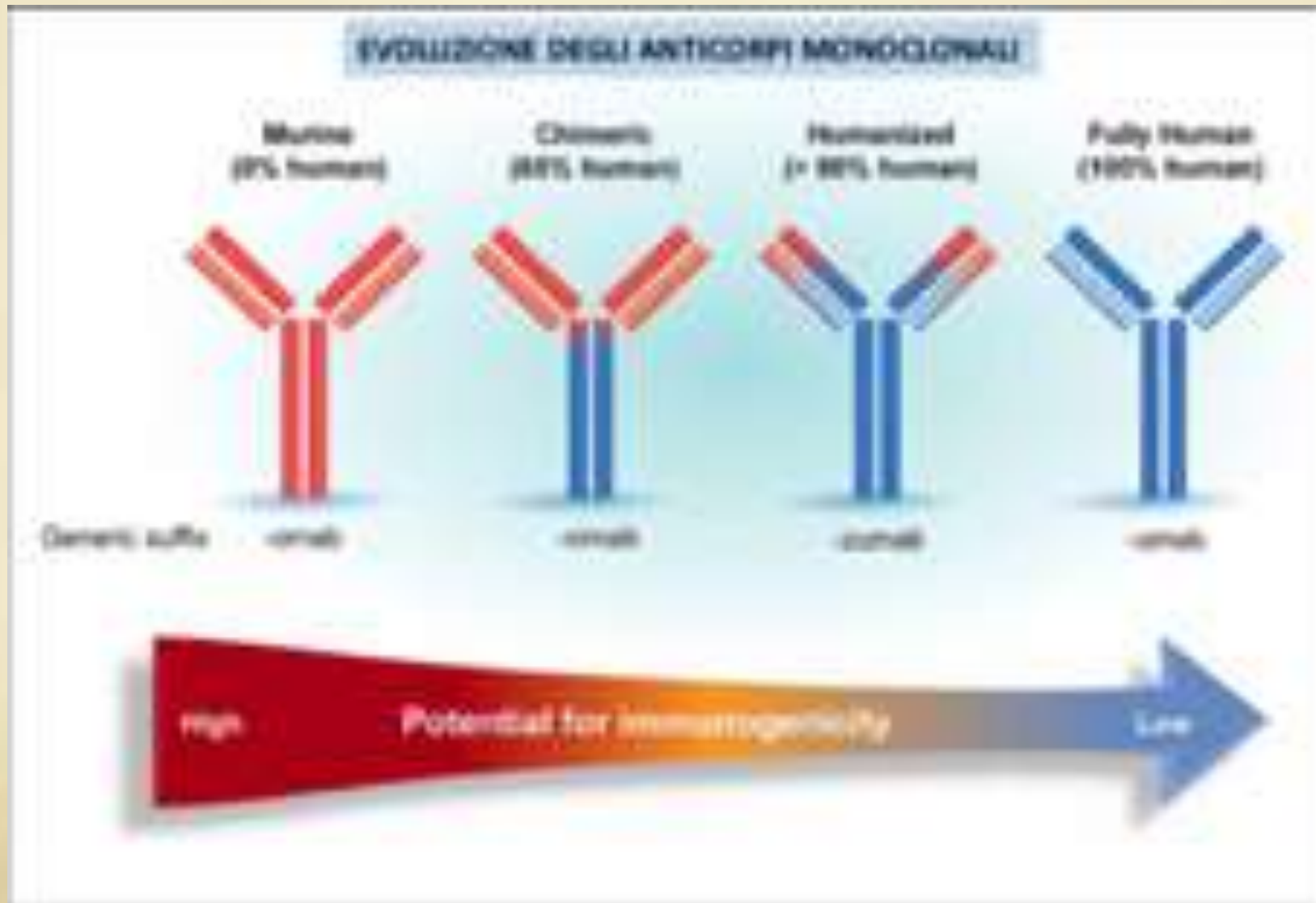
Prof. César Milstein
Prof. Georges Köhler

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 white background and a black border. At the top, the title 'Anticorpi monoclonali (Mab) e terapia antineoplastica' is written in a large, black, serif font. Below the title is a rectangular area containing a photograph of the Nobel Prize award ceremony in 1984. The photo shows three men: César Milstein on the left, Georges Köhler in the center, and another man on the right. Above the photo, the text 'Nobel Prize Award in Medicine and Physiology in 1984' is visible. Below the photo, there is a yellow box with a blue arrow pointing down to it, containing the text 'Tuttavia i linfociti B coltivati in vitro, muoiono dopo brevissimo tempo.' Below the yellow box is a blue curved arrow pointing to the right. At the bottom of the slide, there is a paragraph of text in Italian explaining the discovery of monoclonal antibodies in 1975 by César Milstein and Georges Köhler, who received the Nobel Prize in 1984.

Anticorpi monoclonali (Mab) e terapia antineoplastica



Anticorpi monoclonali (Mab) e terapia antineoplastica

EVOLUZIONE DEGLI ANTICORPI MONOCLONALI

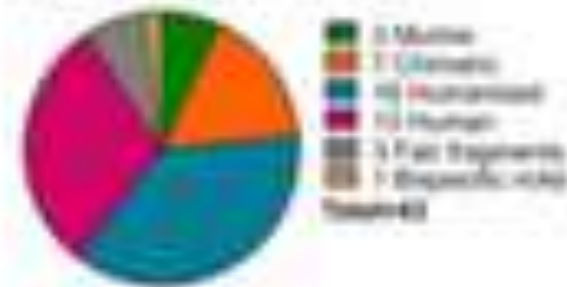
La maggior parte degli anticorpi monoclonali in commercio sono umanizzati o totalmente umani



- 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 NUDI : fanno direttamente le cellule neoplastiche.

ANTICORPI MONOCLONALI CONIUGATI

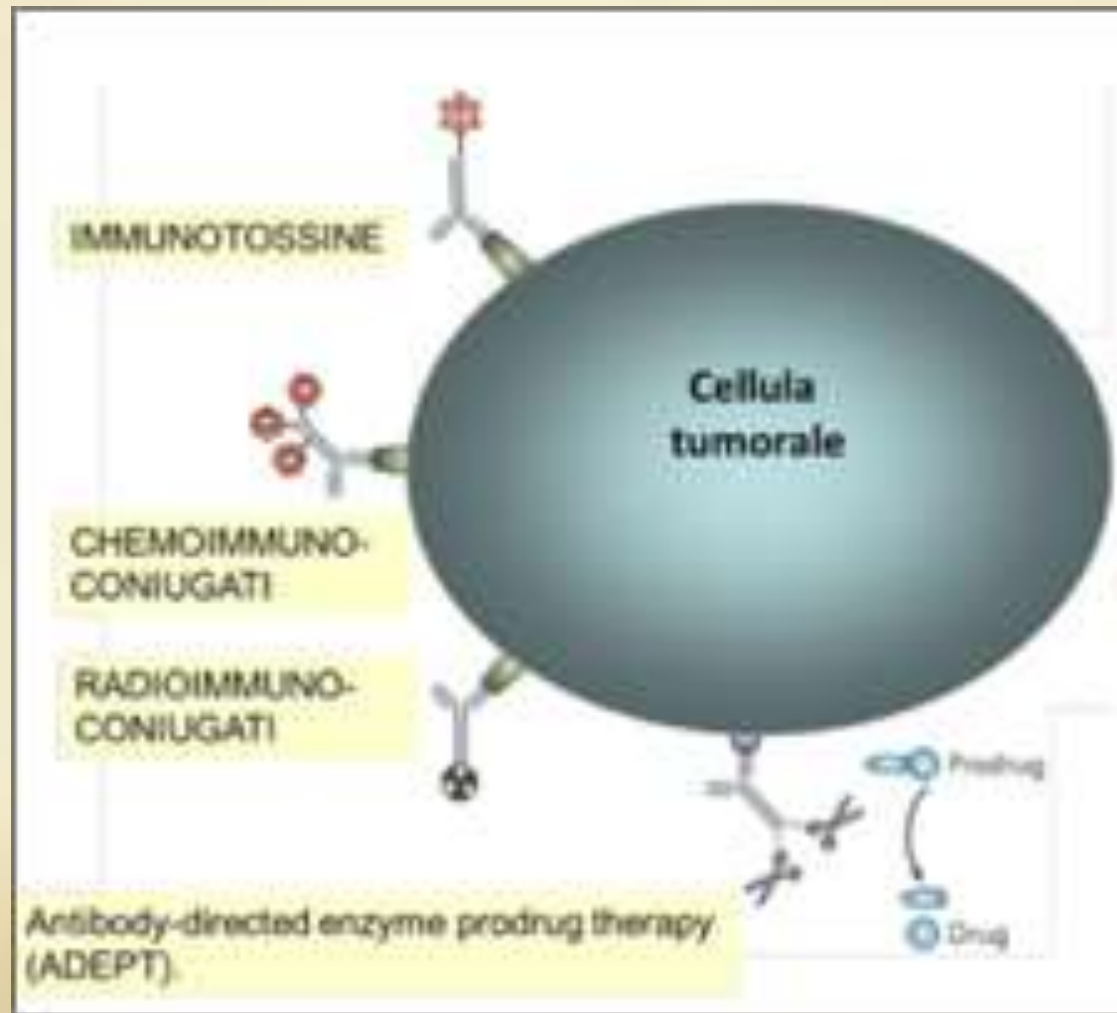
Serum

→ Sostanze Radioattive

→ Farmaci

→ Enzimi attivatori di un profarmaco

Anticorpi monoclonali (Mab) e terapia antineoplastica



ANTICORPI MONOCLONALI APPROVATI PER IL TRATTAMENTO DI VARIE FORME DI CANCRO

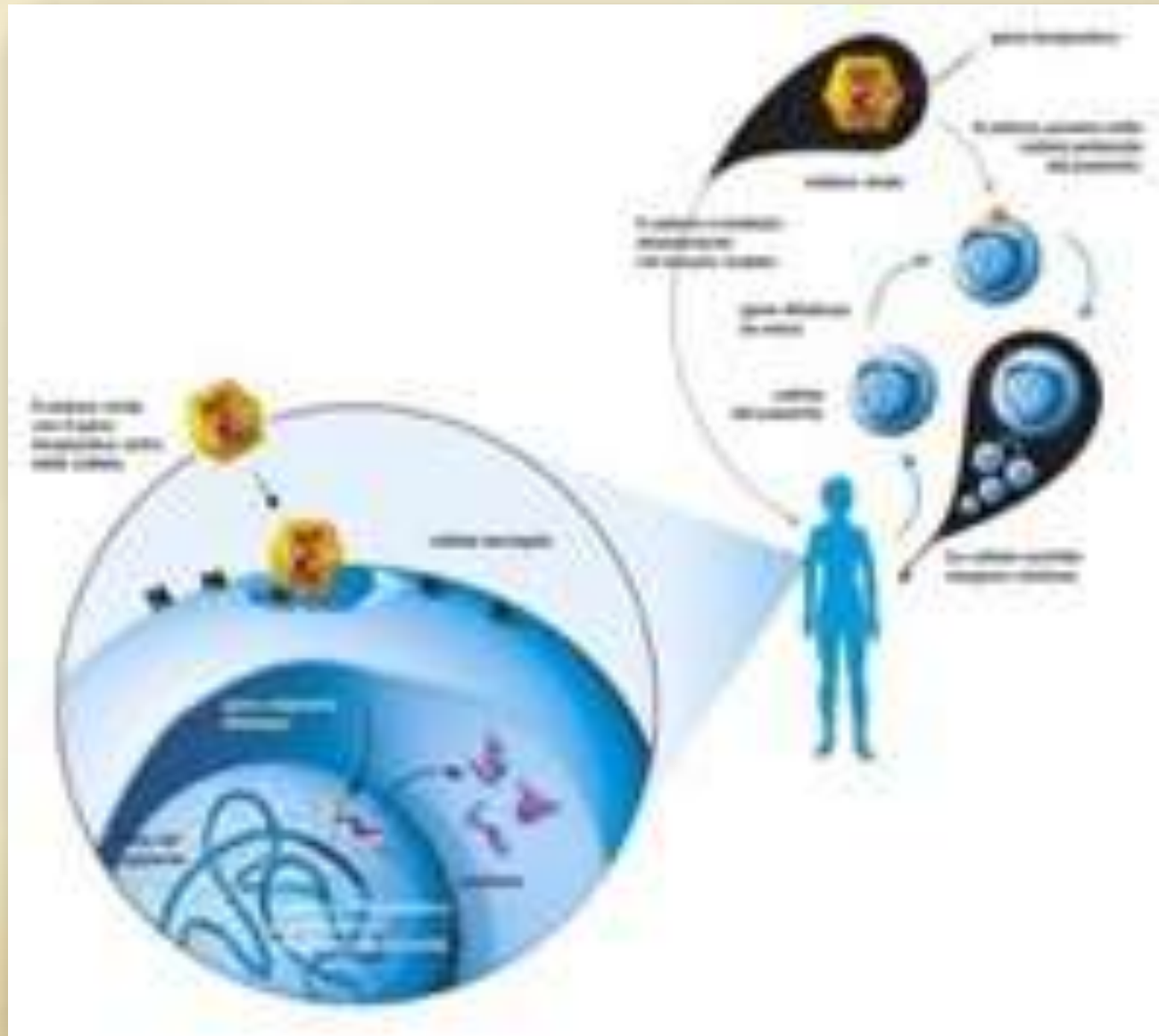
Elenco degli anticorpi monoclonali approvati per il trattamento di varie forme di cancro.

Nome Anticorpo	Indicazioni	Meccanismo d'azione	Classe	Stato di approvazione
Trastuzumab	Carcinoma mammario	Inibizione del recettore HER2	Anticorpo anti-HER2	Approvato
Bevacizumab	Carcinoma colorettale, carcinoma epatocellulare	Inibizione del fattore di crescita vascolare (VEGF)	Anticorpo anti-VEGF	Approvato
Cetuximab	Carcinoma epatocellulare, carcinoma del colon-retto	Inibizione del recettore EGFR	Anticorpo anti-EGFR	Approvato
Ipilimumab	Carcinoma melanomatoso, carcinoma del colon-retto	Inibizione del checkpoint immunitario (CTLA-4)	Anticorpo anti-CTLA-4	Approvato
Nivolumab	Carcinoma melanomatoso, carcinoma del polmone	Inibizione del checkpoint immunitario (PD-1)	Anticorpo anti-PD-1	Approvato
Pembrolizumab	Carcinoma del polmone, carcinoma del colon-retto	Inibizione del checkpoint immunitario (PD-1)	Anticorpo anti-PD-1	Approvato
Atezolizumab	Carcinoma del polmone, carcinoma del colon-retto	Inibizione del checkpoint immunitario (PD-L1)	Anticorpo anti-PD-L1	Approvato
Dostarlimab	Carcinoma del colon-retto	Inibizione del checkpoint immunitario (PD-1)	Anticorpo anti-PD-1	Approvato
Tremimab	Carcinoma del colon-retto	Inibizione del checkpoint immunitario (PD-1)	Anticorpo anti-PD-1	Approvato
Carbimab	Carcinoma del colon-retto	Inibizione del checkpoint immunitario (PD-1)	Anticorpo anti-PD-1	Approvato
Enfortumab	Carcinoma del colon-retto	Inibizione del checkpoint immunitario (VISTA)	Anticorpo anti-VISTA	Approvato
Relatlimab	Carcinoma del colon-retto	Inibizione del checkpoint immunitario (LAG-3)	Anticorpo anti-LAG-3	Approvato
Ipilimumab + Nivolumab	Carcinoma melanomatoso, carcinoma del colon-retto	Inibizione dei checkpoint immunitari (CTLA-4 e PD-1)	Combinazione	Approvato
Ipilimumab + Atezolizumab	Carcinoma del polmone	Inibizione dei checkpoint immunitari (CTLA-4 e PD-L1)	Combinazione	Approvato
Nivolumab + Ipilimumab	Carcinoma del polmone	Inibizione dei checkpoint immunitari (PD-1 e CTLA-4)	Combinazione	Approvato
Nivolumab + Atezolizumab	Carcinoma del polmone	Inibizione dei checkpoint immunitari (PD-1 e PD-L1)	Combinazione	Approvato
Pembrolizumab + Atezolizumab	Carcinoma del polmone	Inibizione dei checkpoint immunitari (PD-1 e PD-L1)	Combinazione	Approvato
Atezolizumab + Nivolumab	Carcinoma del polmone	Inibizione dei checkpoint immunitari (PD-L1 e PD-1)	Combinazione	Approvato
Atezolizumab + Ipilimumab	Carcinoma del polmone	Inibizione dei checkpoint immunitari (PD-L1 e CTLA-4)	Combinazione	Approvato
Ipilimumab + Nivolumab + Atezolizumab	Carcinoma del polmone	Inibizione dei checkpoint immunitari (CTLA-4, PD-1 e PD-L1)	Combinazione	Approvato
Ipilimumab + Nivolumab + Atezolizumab + Carbimab	Carcinoma del colon-retto	Inibizione dei checkpoint immunitari (CTLA-4, PD-1 e VISTA)	Combinazione	Approvato
Ipilimumab + Nivolumab + Atezolizumab + Relatlimab	Carcinoma del colon-retto	Inibizione dei checkpoint immunitari (CTLA-4, PD-1 e LAG-3)	Combinazione	Approvato
Ipilimumab + Nivolumab + Atezolizumab + Enfortumab	Carcinoma del colon-retto	Inibizione dei checkpoint immunitari (CTLA-4, PD-1 e VISTA)	Combinazione	Approvato
Ipilimumab + Nivolumab + Atezolizumab + Relatlimab + Enfortumab	Carcinoma del colon-retto	Inibizione dei checkpoint immunitari (CTLA-4, PD-1, LAG-3 e VISTA)	Combinazione	Approvato

Nota: Le indicazioni e lo stato di approvazione possono variare in base alle autorità regolatorie e alle evidenze scientifiche.



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 cm² di superficie non si rigenera spontaneamente in modo spontaneo, se non con formazione di **tessuto cicatriziale !!!!**

ULCERA DIABETICA

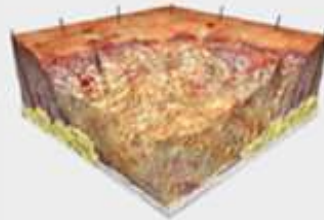
(estensione limitata ma difficili da guarire)



Pelle Ingegnerizzata: cura delle ustioni

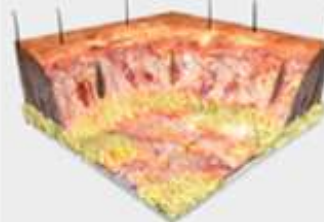
DAY 0: PRE-TREATMENT

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

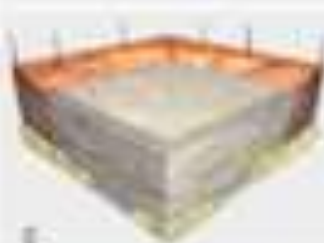
Prepare wound bed using standard methods to ensure wound is free of debris and necrotic tissue. Regardless of how well the wound has been prepared and how healthy it looks, INTEGRA™ Matrix Wound Dressing must not be placed on an existing wound surface. The entire existing wound must be completely excised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



DAY 1: APPLICATION

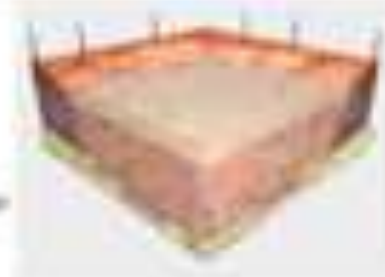
INTEGRA™ Matrix Wound Dressing is applied to the excised wound bed (A). Thump results for proper adhesion of application, affixing it to the wound. The INTEGRA Matrix conforms to and covers the wound surface. It can be affixed with sutures, staples, or any suitable adhesive.

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 progression, the collagen synthesis of the INTEGRA Formable is reduced to collagen synthesis 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 remains biodegradable and is absorbed into the body during the healing process.



DAY 21+ EPIDERMAL AUTOGRAFT

A 1mm-2.0mm-3.0mm or 3.0mm-5.0mm area of normal epidermal is applied over the new dermis.



DAY 25-30 REGENERATED SKIN

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



Pelle Ingegnerizzata: l'ulcera diabetica

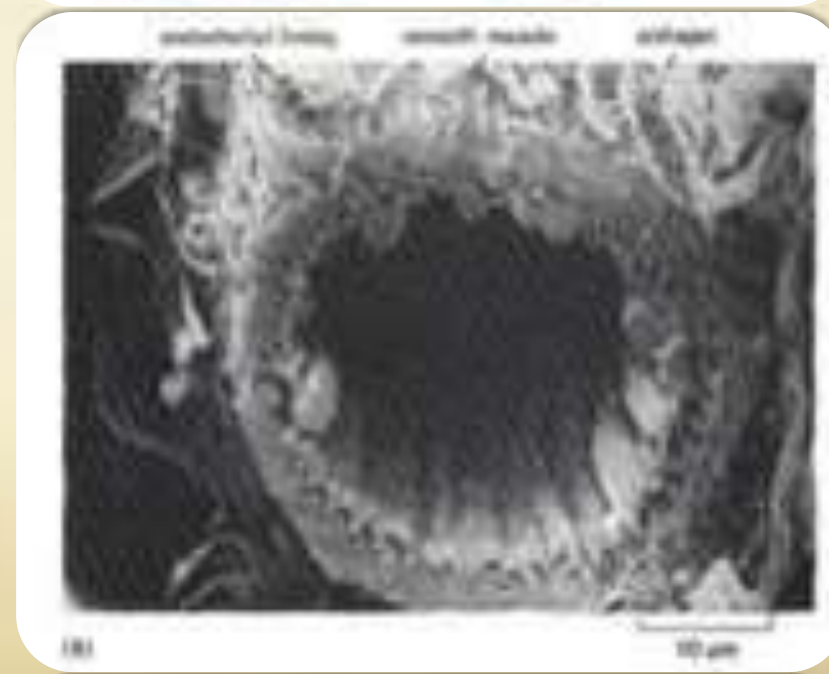
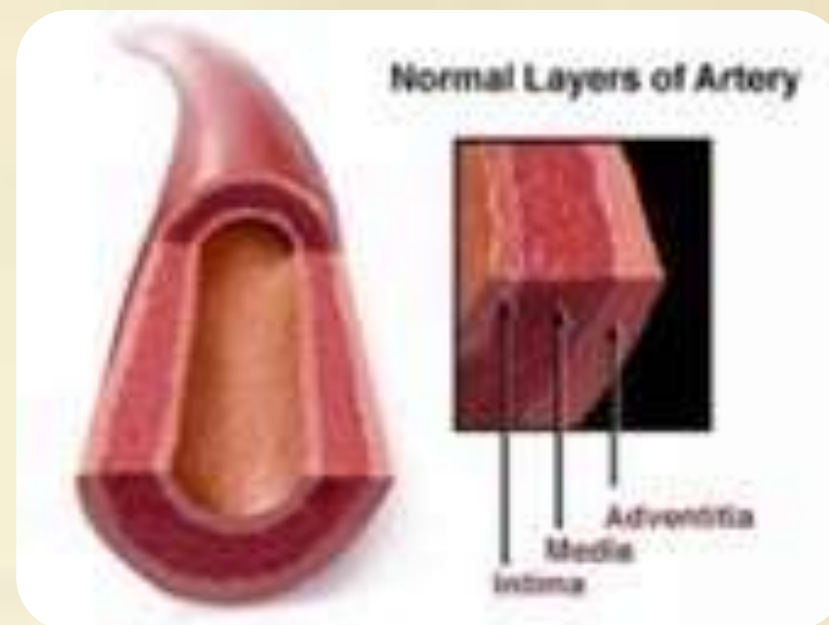


Vasi sanguigni

- **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)

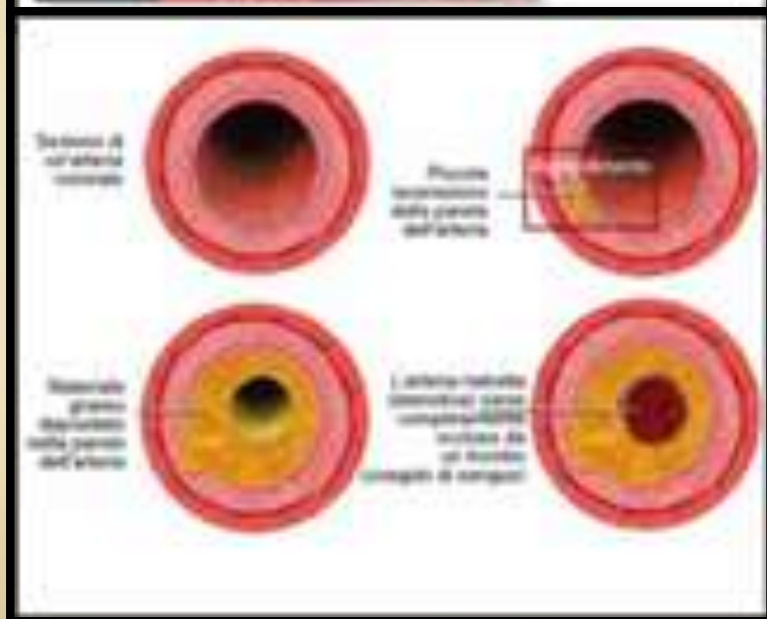
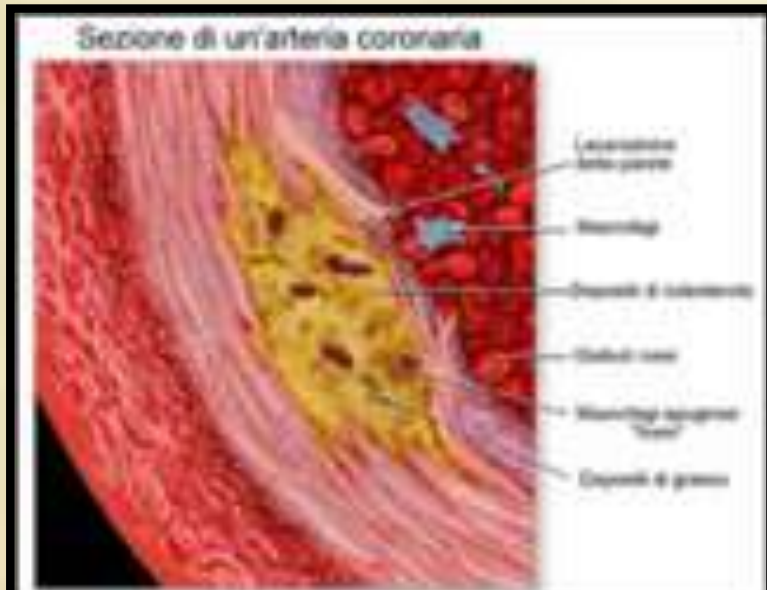
ORGANIZZAZIONE:

- ✓ **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

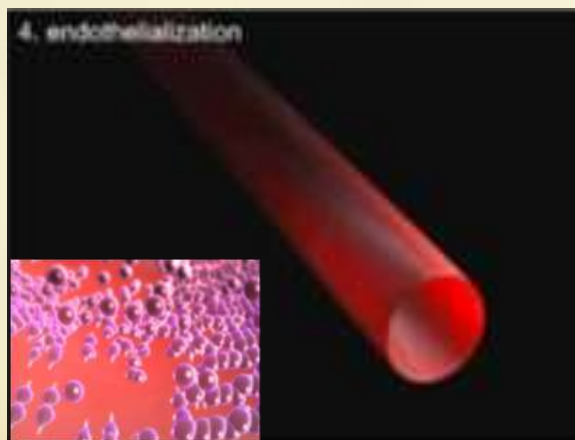
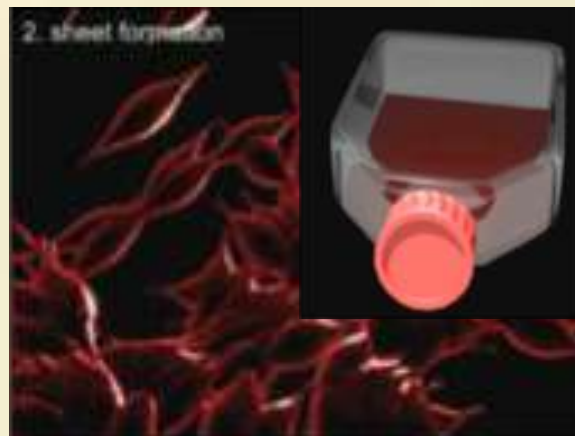
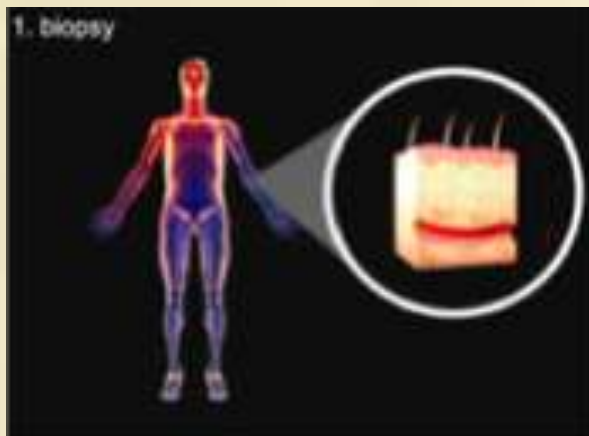


Vasi sanguigni

- OCCLUSIONE: l'occlusione del lume di un vaso a causa della formazione di placche aterosclerotiche può causare diminuzione di flusso sanguigno agli organi.
- Nel caso delle arterie coronarie il rischio è quello di infarto del miocardio.



Vasi sanguigni ingegnerizzati



Grazie per l'attenzione! 😊

