

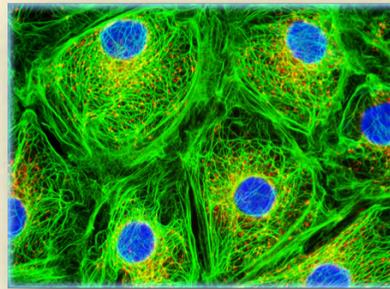
# Le Biotecnologie e la Salute Umana

Giuseppe Procino

# La ricerca scientifica e lo sviluppo della terapia



Individuare il gene alterato



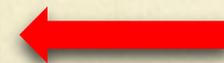
Capire quali sono le conseguenze a livello cellulare



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



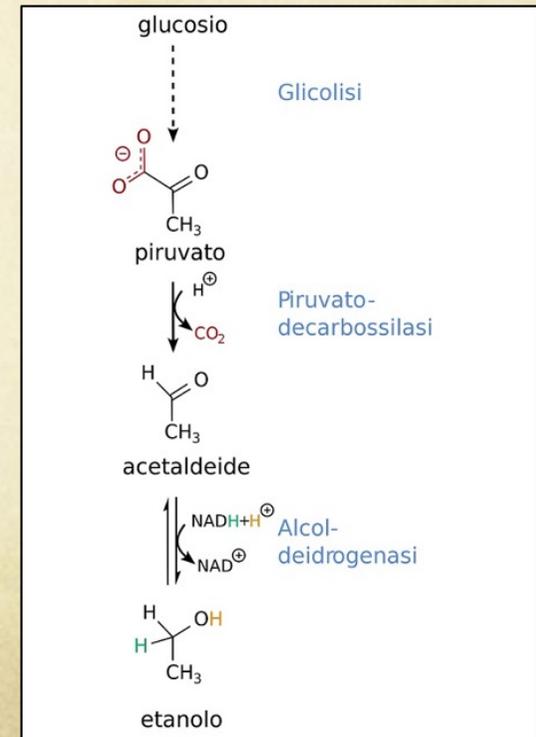
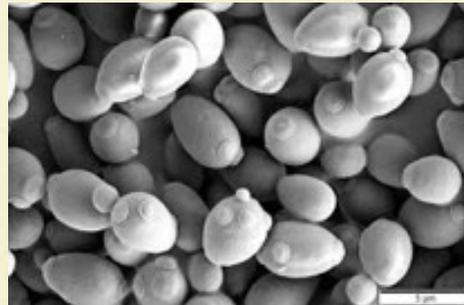
# Le biotecnologie: scienze antiche

- 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

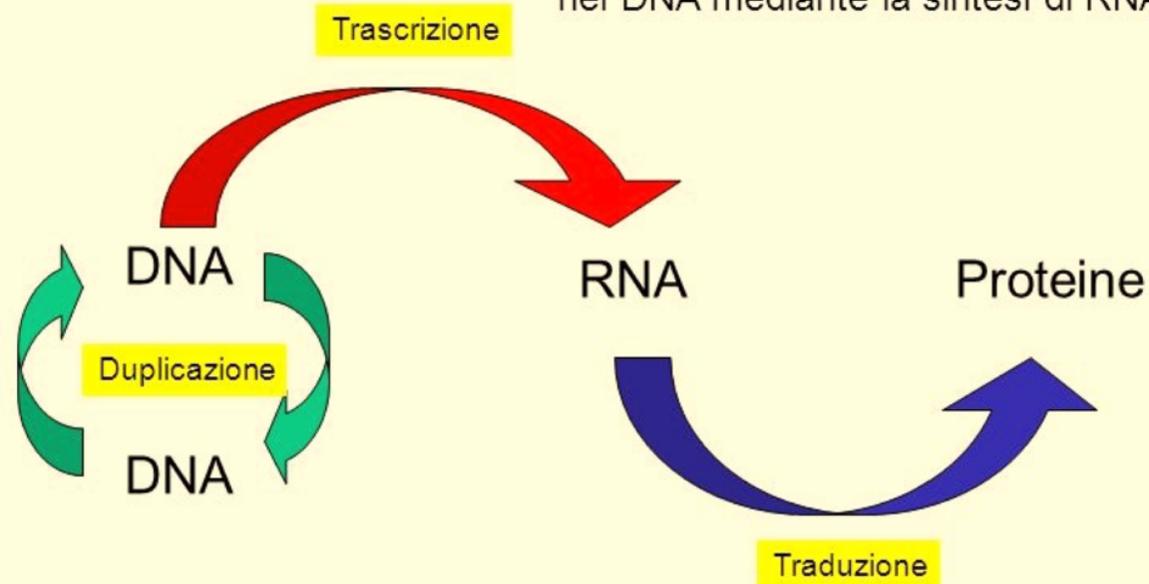
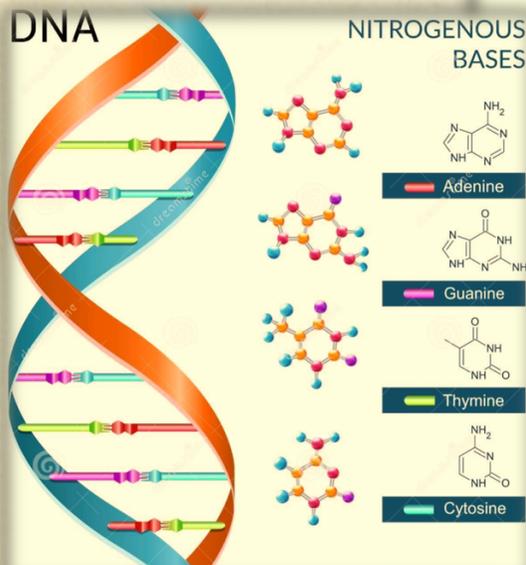
- La lievitazione del pane, la produzione di birra, formaggi e yogurt sono processi biotecnologici che utilizzano microrganismi o enzimi presenti in natura per trasformare materie prime alimentari in prodotti più gradevoli al palato, più digeribili e più facilmente conservabili.



# Le moderne biotecnologie

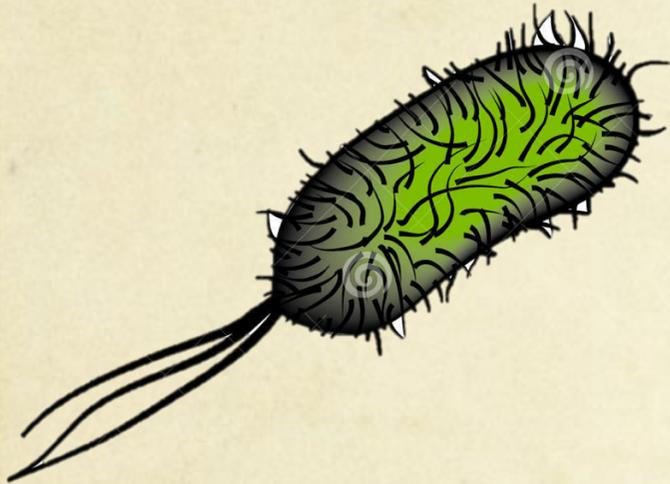
## IL “DOGMA CENTRALE” DELLA BIOLOGIA

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

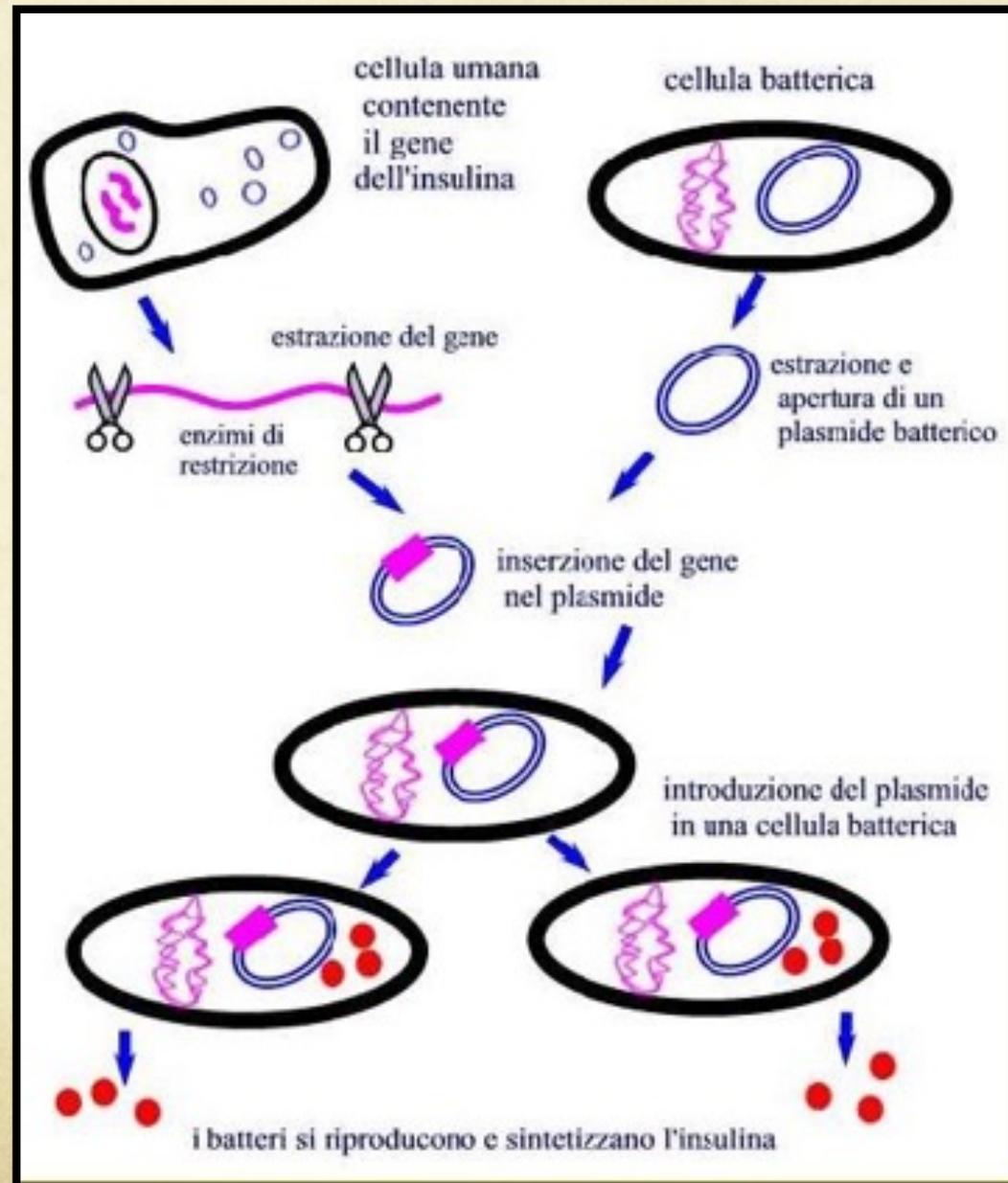


Costruzione della catena polipeptidica

# 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*)

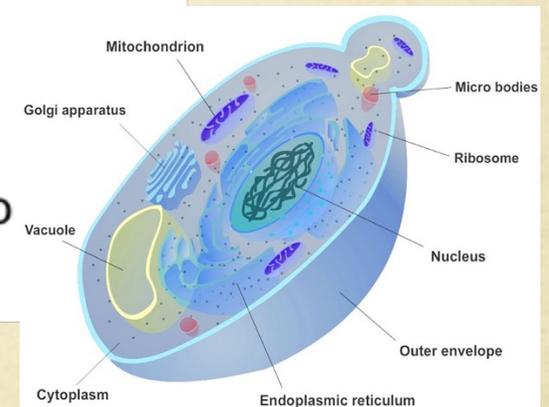
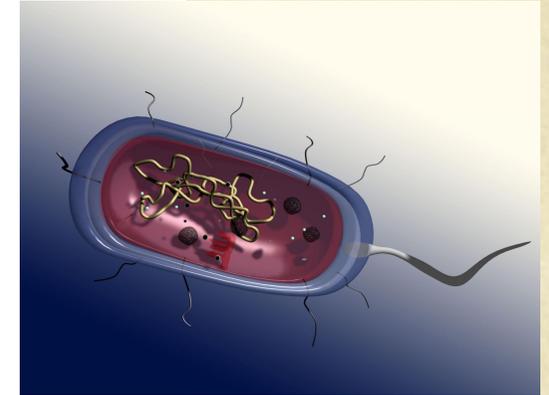
I microrganismi sono facilmente manipolabili, economici, modificabili in tempi rapidi. Tuttavia, le proteine prodotte nei batteri sono prive di modificazioni post-traduzionali. Spesso offrono proteine denaturate che necessitano di refolding. Problemi con proteine multimeriche e contenenti ponti disolfuro.



**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.



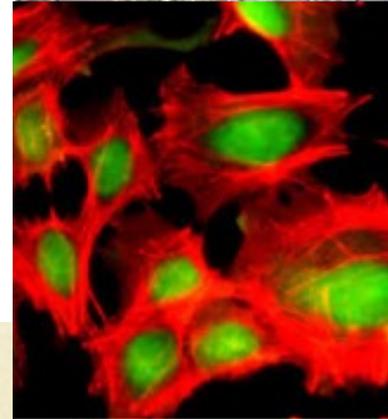
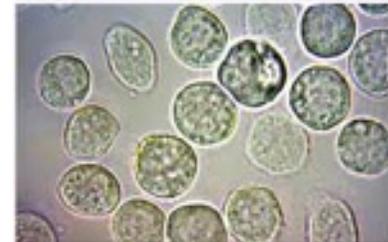
## SISTEMI DI ESPRESSIONE PER LA PRODUZIONE DI PROTEINE RICOMBINANTI

### 3) LE CELLULE IN COLTURA DI INSETTO

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

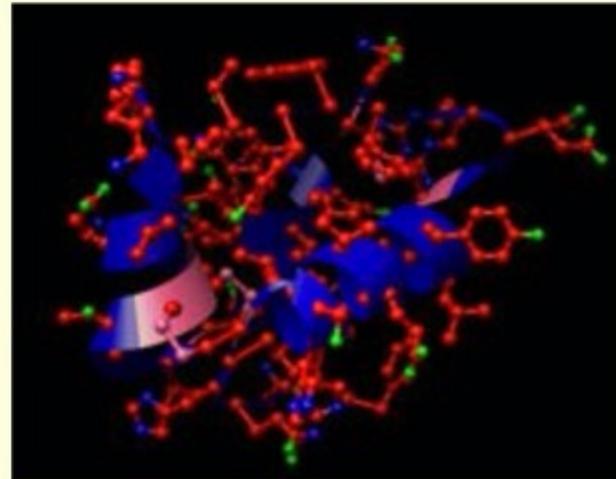
### 4) LE CELLULE IN COLTURA DI MAMMIFERO

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.

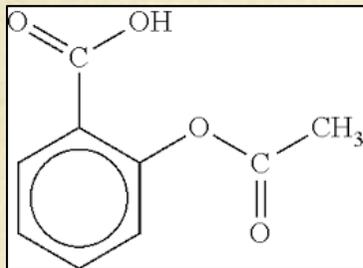


La struttura dell'Insulina  
rosso:carbonio, verde:ossigeno;  
blu:azoto; rosa:zolfo

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

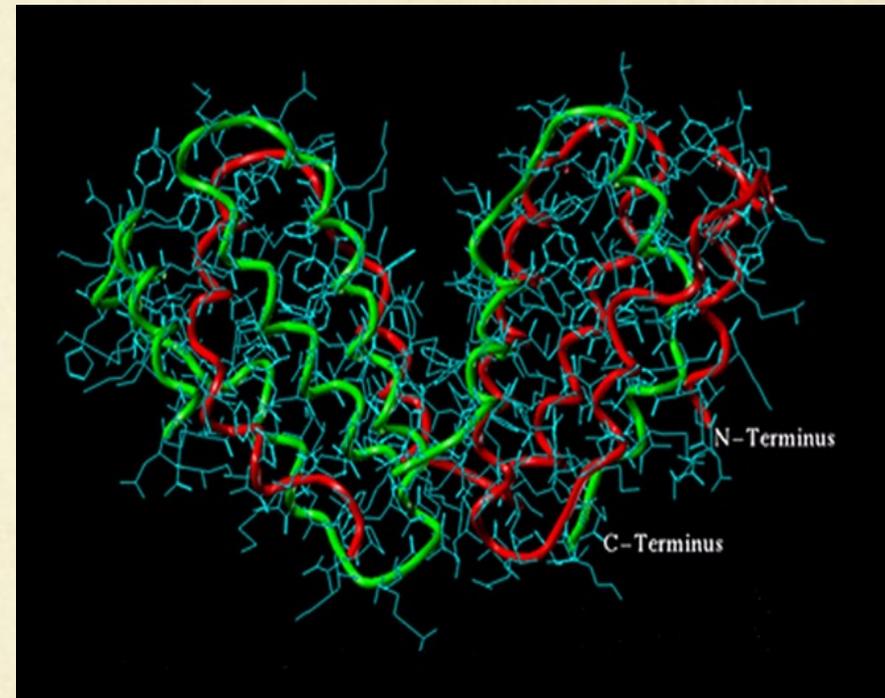
## Chimici



**Aspirina: Peso molecolare 180**

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

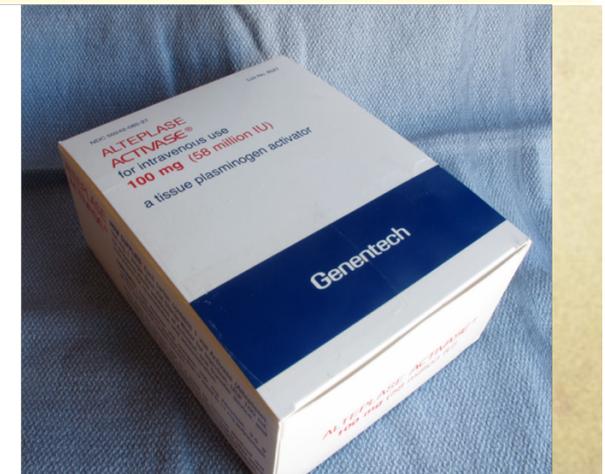
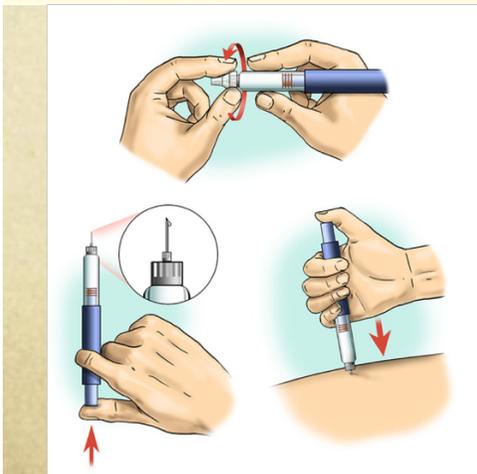
## Biotecnologici



**Interferone beta: peso molecolare 19.000**

# 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 insulino-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 ( $\alpha$  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>**

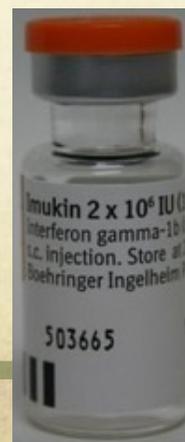


**Interferone  $\alpha$** : usato nel trattamento di cancro al rene, melanoma, alcune forme di linfoma e leucemie.

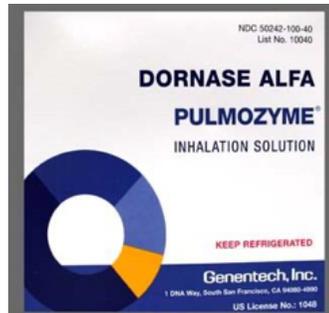
**IntronA<sup>®</sup>**, **Infergen<sup>®</sup>**, **Alfaferone<sup>®</sup>**, **Roferon-A<sup>®</sup>**

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

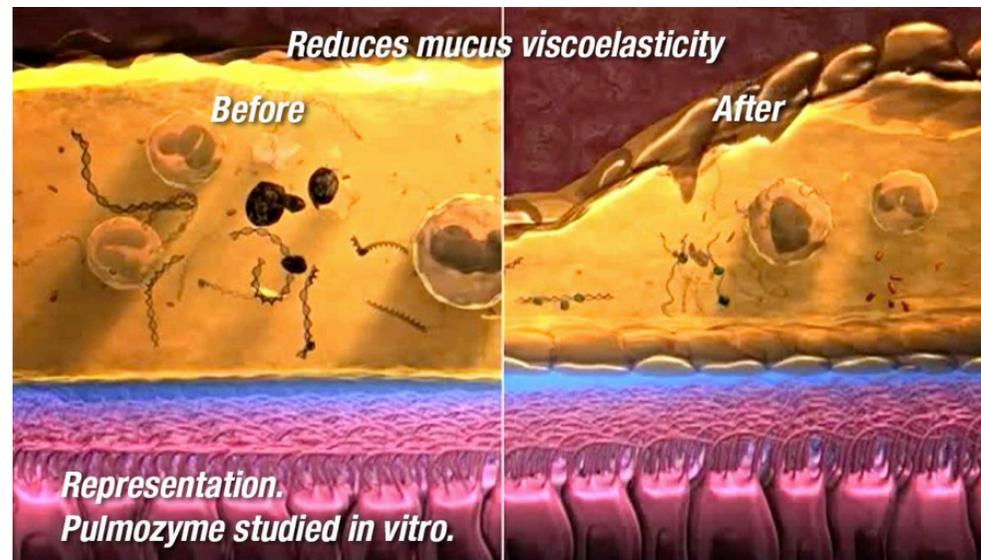
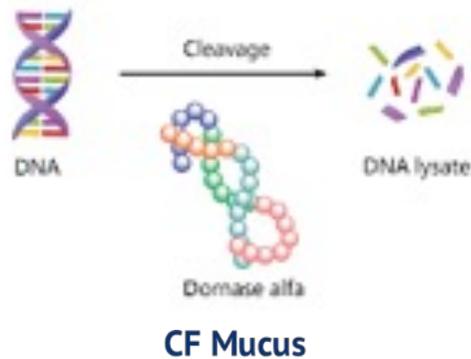
**Imukin<sup>®</sup>**



## DNASE-DRONASE ALFA (PULMOZYME)



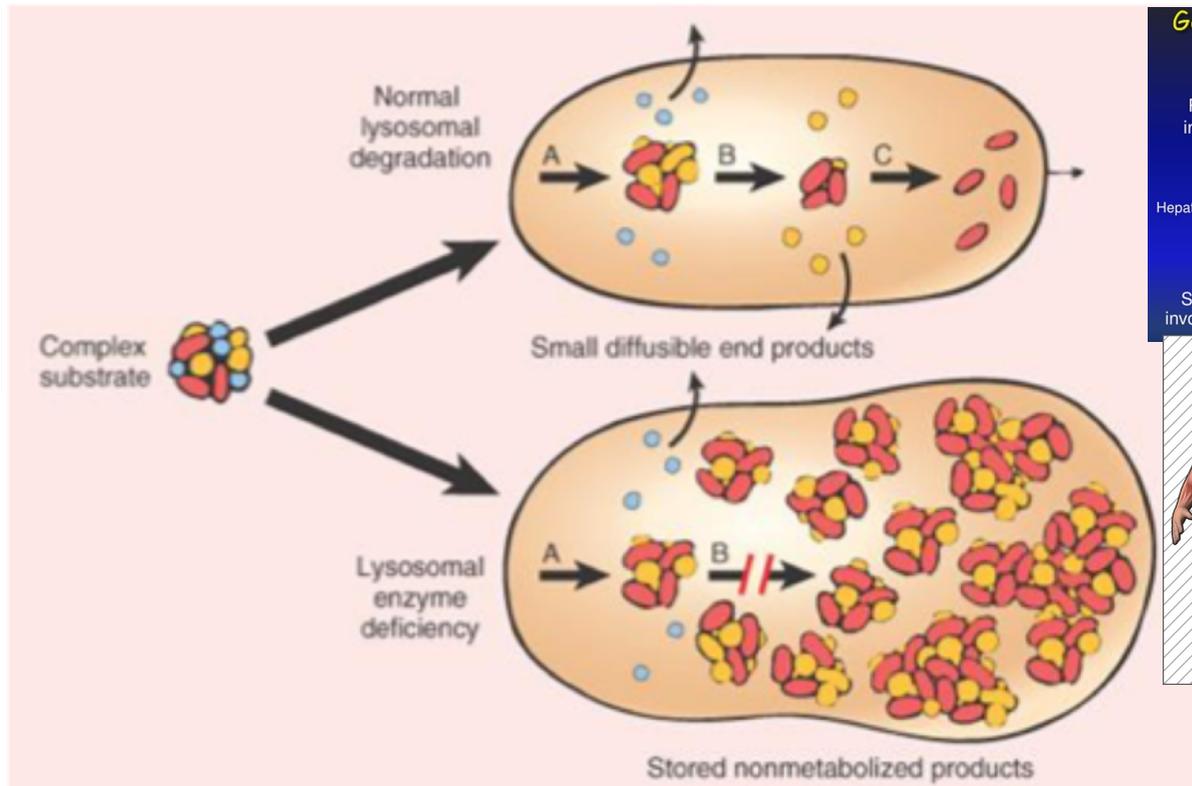
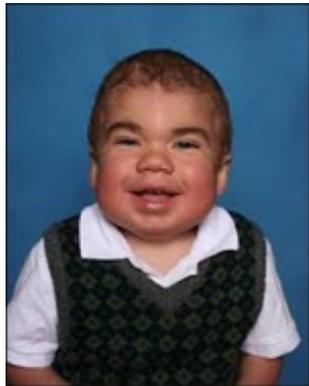
Farmaco impiegato nel trattamento della FIBROSI CISTICA. Il dornase alfa idrolizza il DNA presente nell'espettorato e nel muco delle vie aeree e ne riduce la viscosità a livello del polmone. La ritenzione di secrezioni viscoso purulente nelle vie respiratorie riduce la funzionalità polmonare ed esacerba 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.



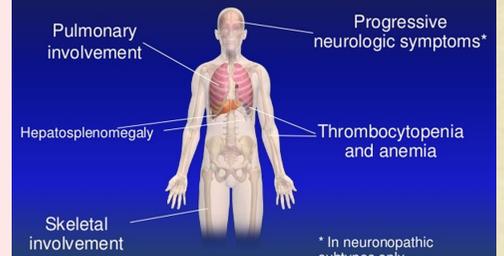
Somministrato per via inalatoria (ampolle monodose 2.5 mL) non ha effetto sul DNA intracellulare.

## ENZIMI PER IL TRATTAMENTO DI MALATTIE DA ACCUMULO LISOSOMIALE

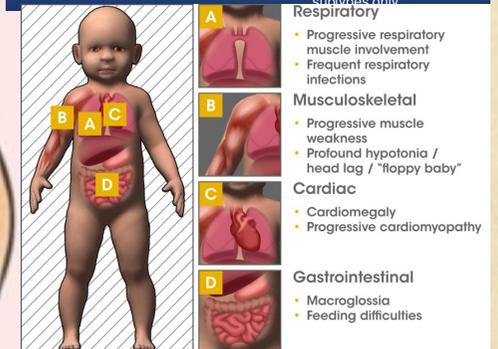
Le **malattie da accumulo lisosomiale** o (**LSD**) acronimo dall'inglese *Lysosomal Storage Disease* sono un'eterogenea famiglia di patologie, circa 50, dovute a diversi tipi di difetti genetici, accomunate dalla caratteristica di determinare un accumulo di metaboliti o sostanze nei lisosomi con conseguente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



### Gaucher Disease: Clinical Signs and Symptoms



\* In neuronopathic subtypes only



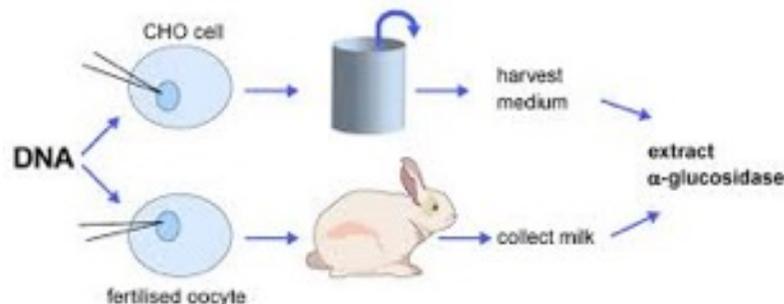
1. Imiglucerasse (*Cerezyme*) → malattia di Gaucher
2. Alglucosidase alfa (*Myozyme, Lumizyme*) → malattia di Pompe
3. Idursulfase (*Elaprase*) → sindrome di Hunter

## TERAPIA ENZIMATICA DELLA MALATTIA DI POMPE

### ALGLUCOSIDASE ALFA (MYOZYME, LUMIZYME)

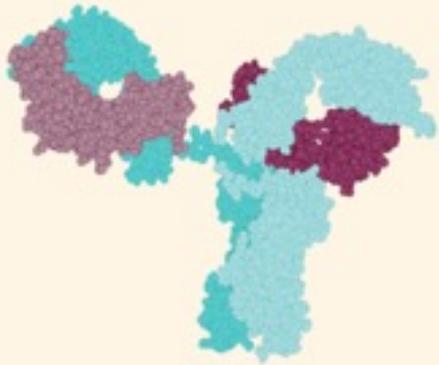


- Myozyme si presenta sotto forma di polvere per la preparazione di una soluzione per **infusione endovenosa**.
- Ha dimostrato di **umentare significativamente la sopravvivenza** di soggetti affetti da malattia di Pompe. L'83% dei pazienti trattati col Myozyme è sopravvissuto ed ha raggiunto l'autonomia 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**.

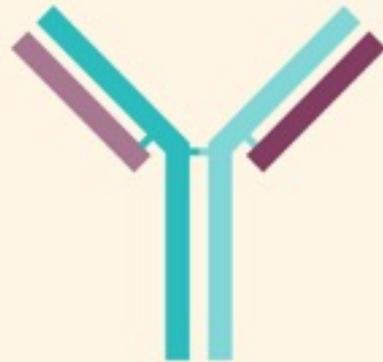


# Gli anticorpi in Biotecnologie

medicalillustrators.com



Gli anticorpi  
in realtà  
sono fatti così...



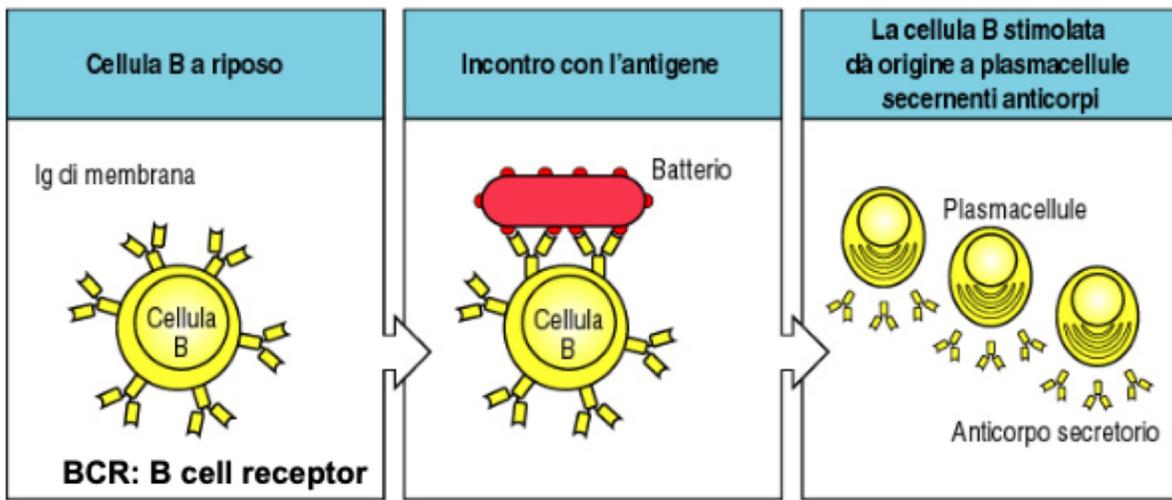
...ma li rappresentiamo  
solitamente  
in questo modo



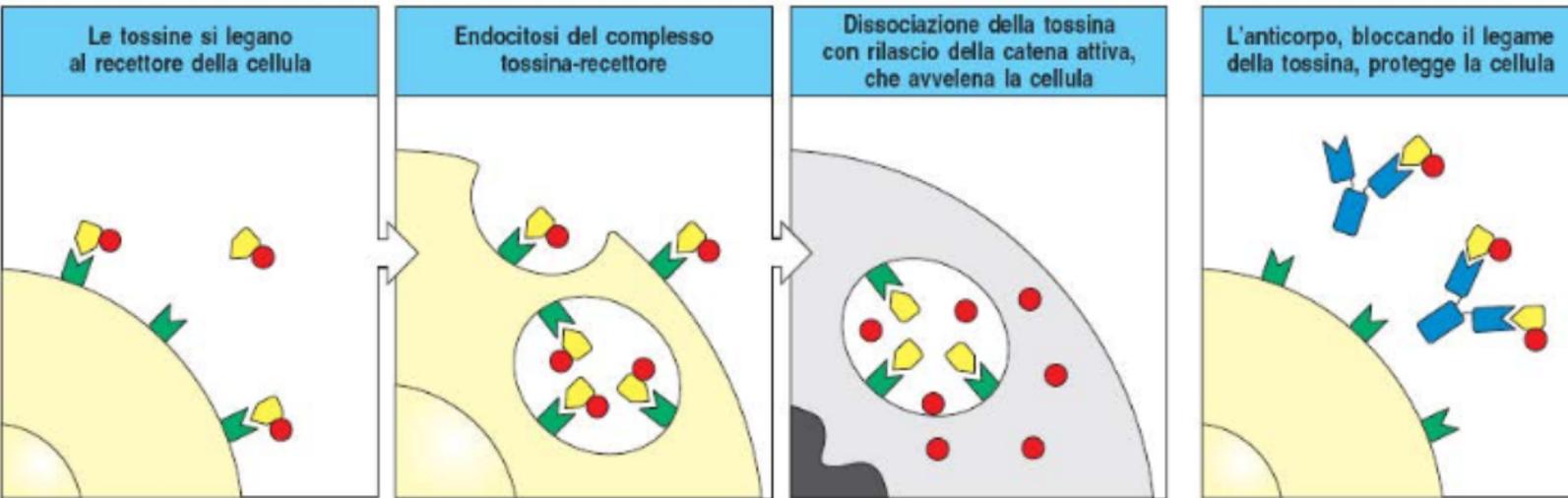
Sono composti  
da quattro blocchi...



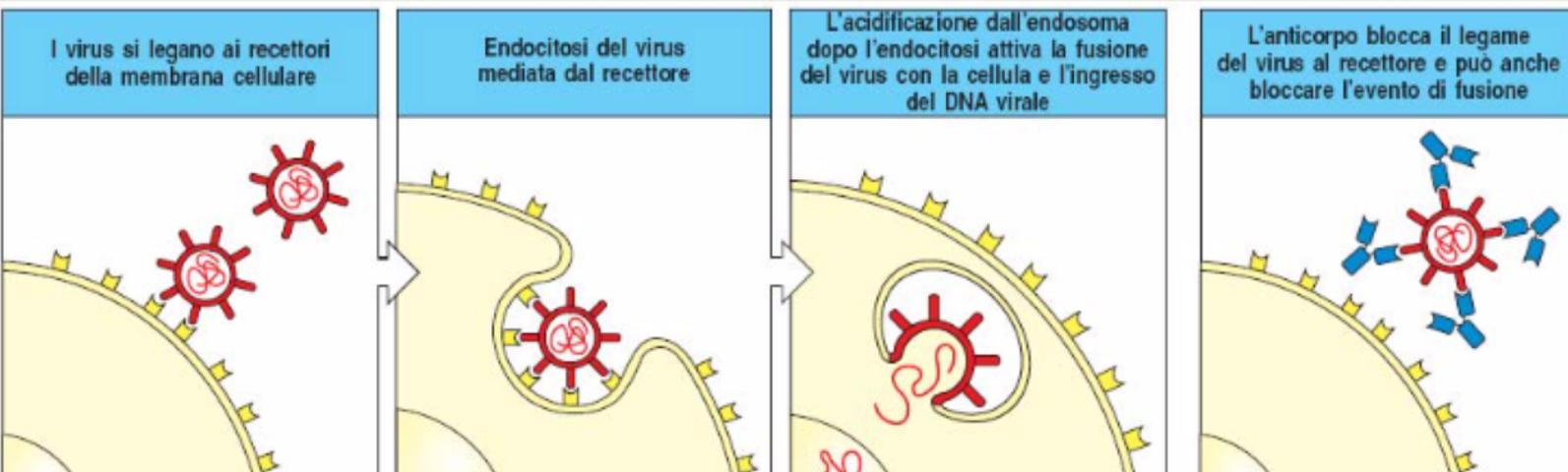
...e due tipi  
di regioni



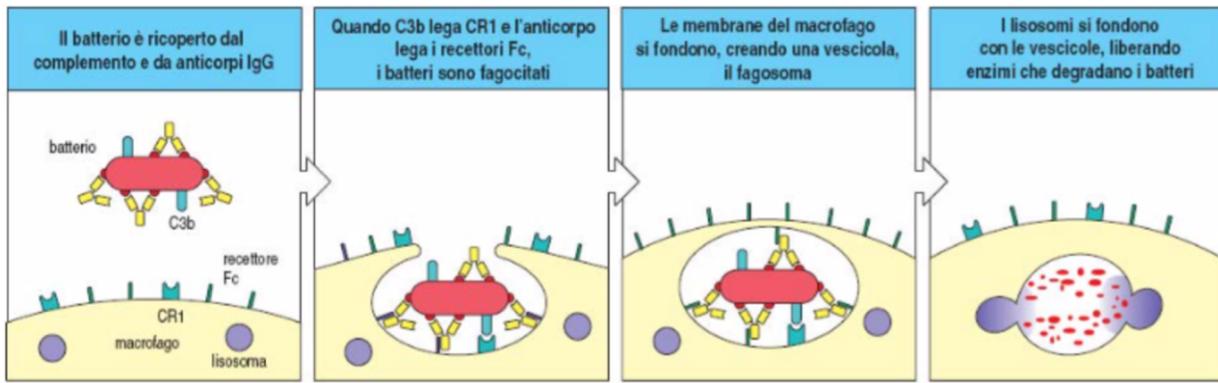
Produzione



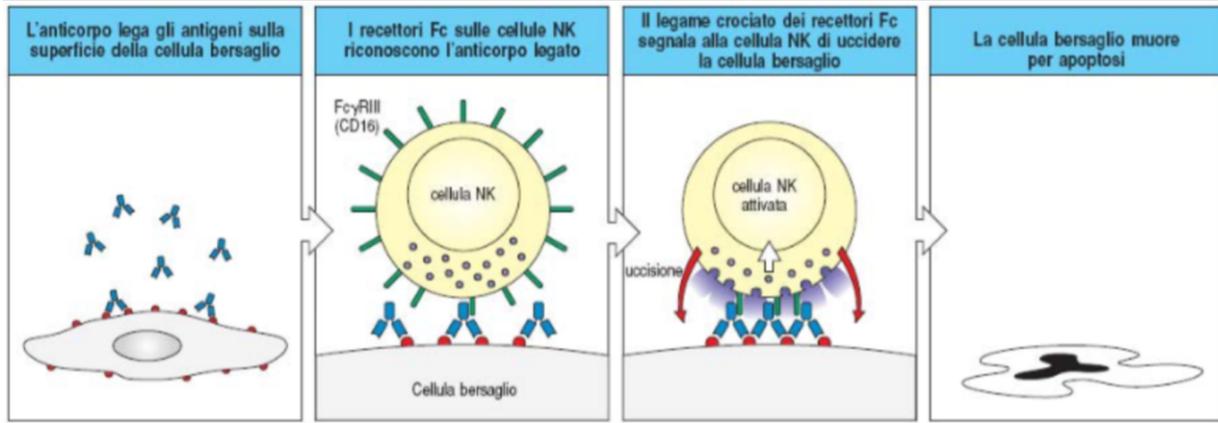
Inattivano le tossine batteriche



Impediscono l'ingresso in cellula di virus e batteri



## Fagocitosi batterica



## Eliminazione di cellule tumorali

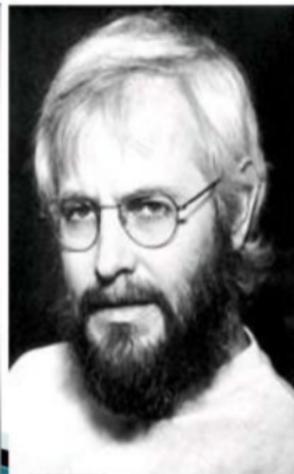
# Anticorpi monoclonali (Mab) e terapia antineoplastica

Nobel Prize Award in Medicine and  
Physiology in 1984

Prof. Niels Kaj Jerne



Prof. Georges J. F.  
Köhler



Prof. César Milstein



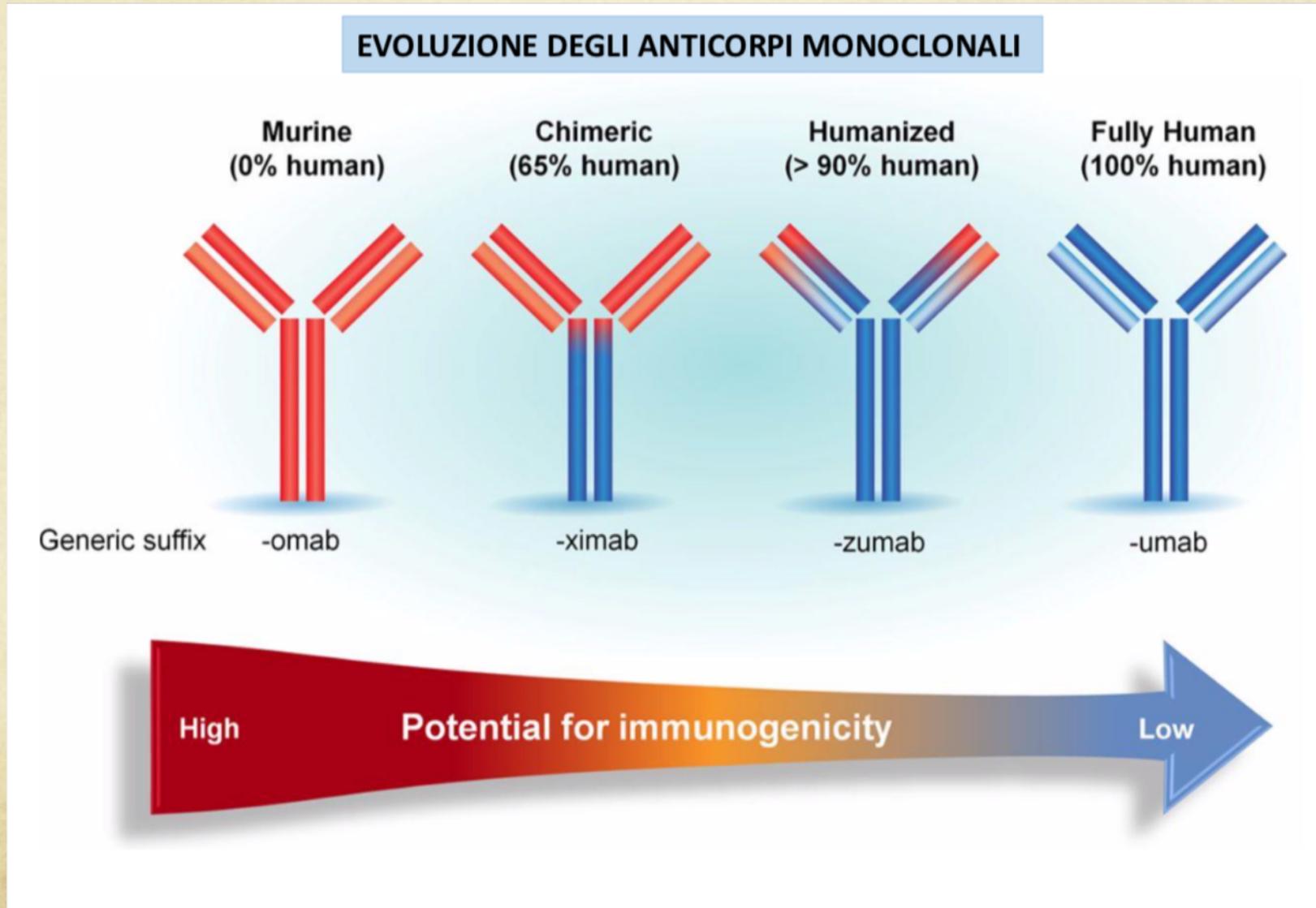
↓

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

↻

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

# Anticorpi monoclonali (Mab) e terapia antineoplastica



# Anticorpi monoclonali (Mab) e terapia antineoplastica

## EVOLUZIONE DEGLI ANTICORPI MONOCLONALI

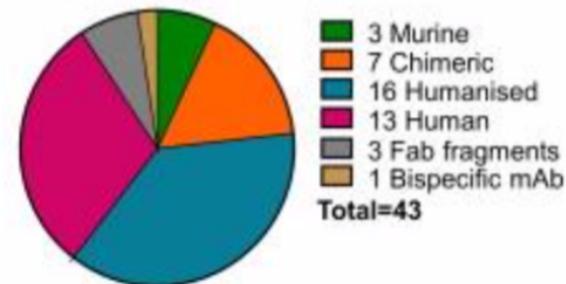
La maggior parte degli anticorpi monoclonali in commercio sono umanizzati o totalmente umani



- 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 antibodies



# 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** : lisano direttamente le cellule neoplastiche

**ANTICORPI MONOCLONALI CONIUGATI**

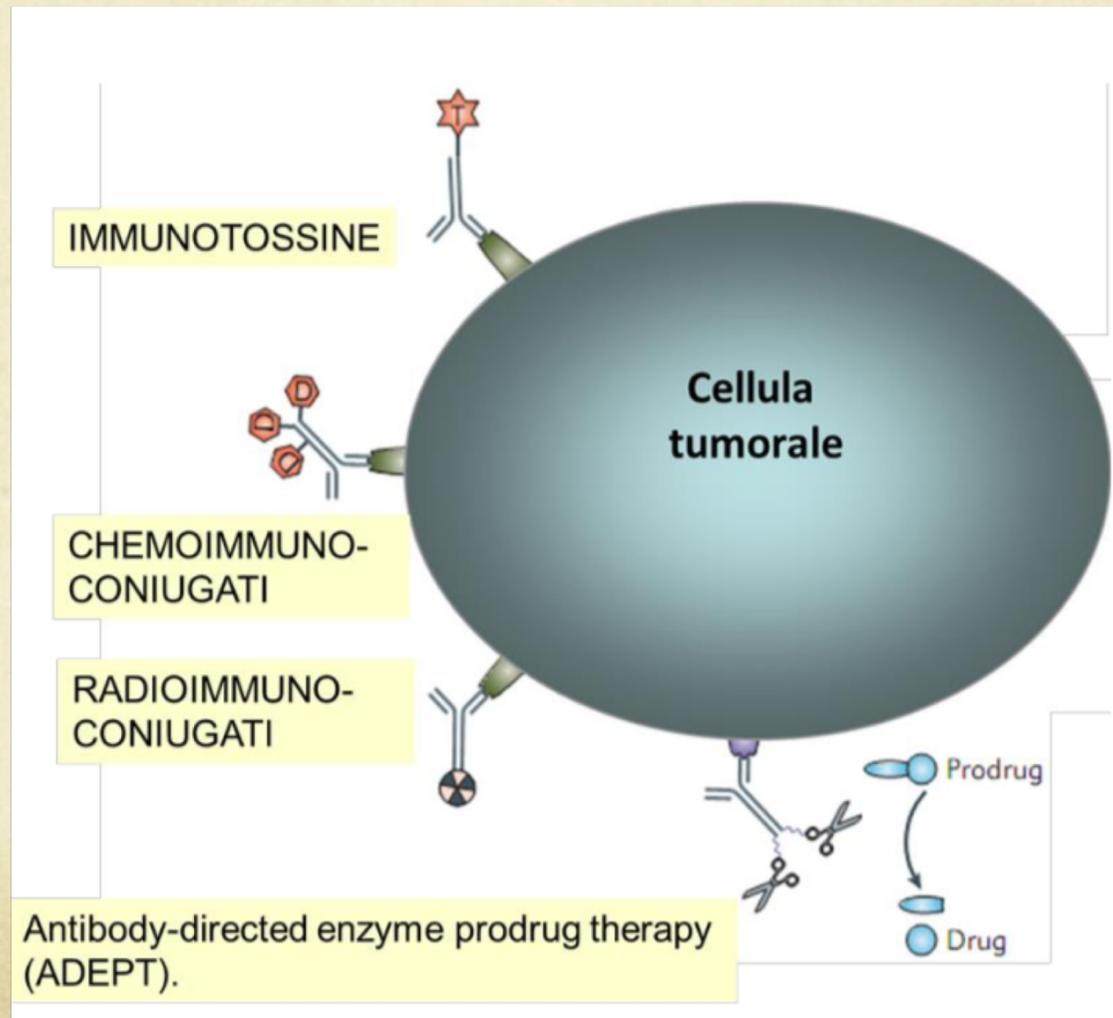
Tossine

Sostanze Radioattive

Farmaci

Enzimi attivatori di un profarmaco

# Anticorpi monoclonali (Mab) e terapia antineoplastica



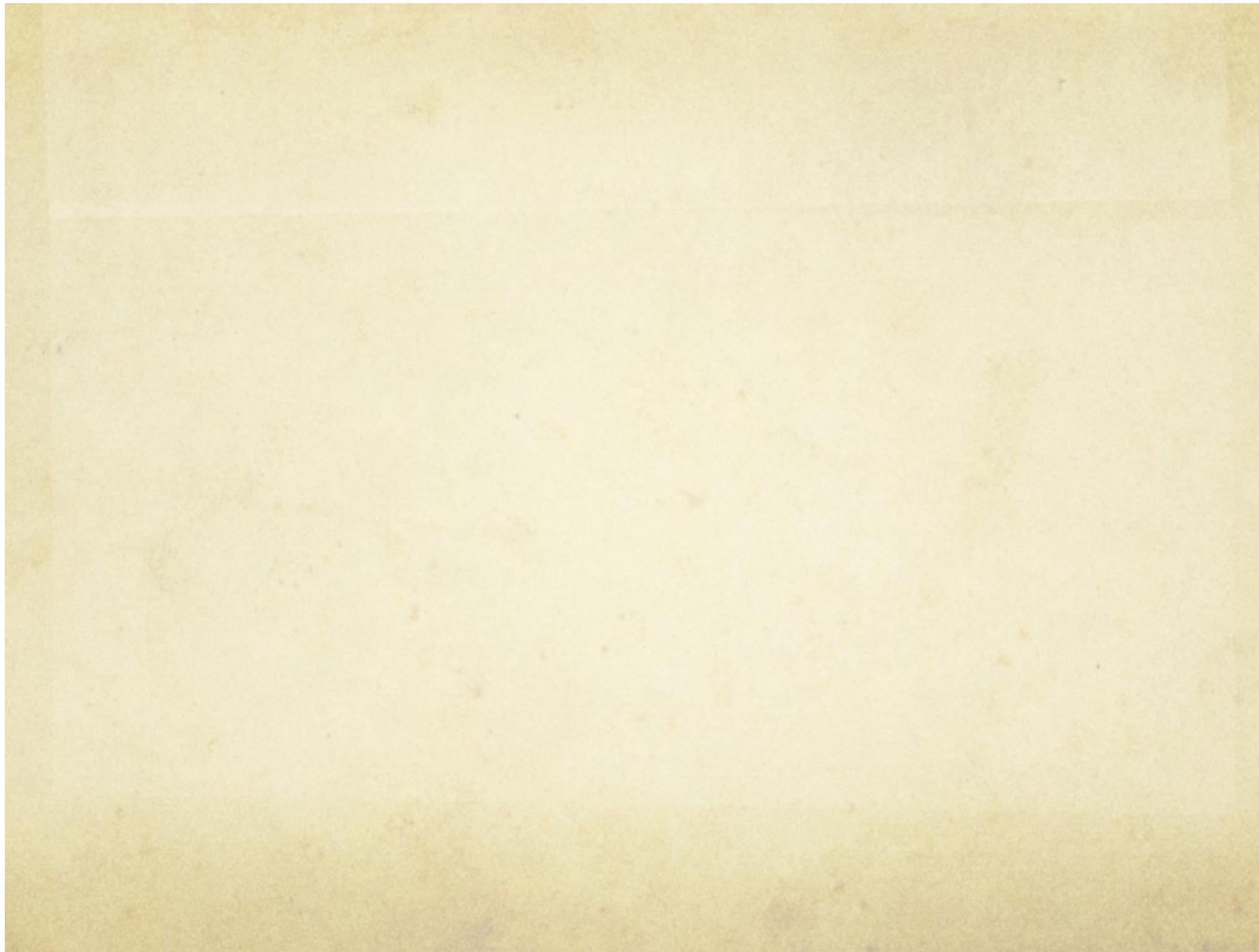
## ANTICORPI MONOCLONALI APPROVATI PER IL TRATTAMENTO DI VARIE FORME DI CANCRO

FDA approved antibodies for the treatment of cancer.

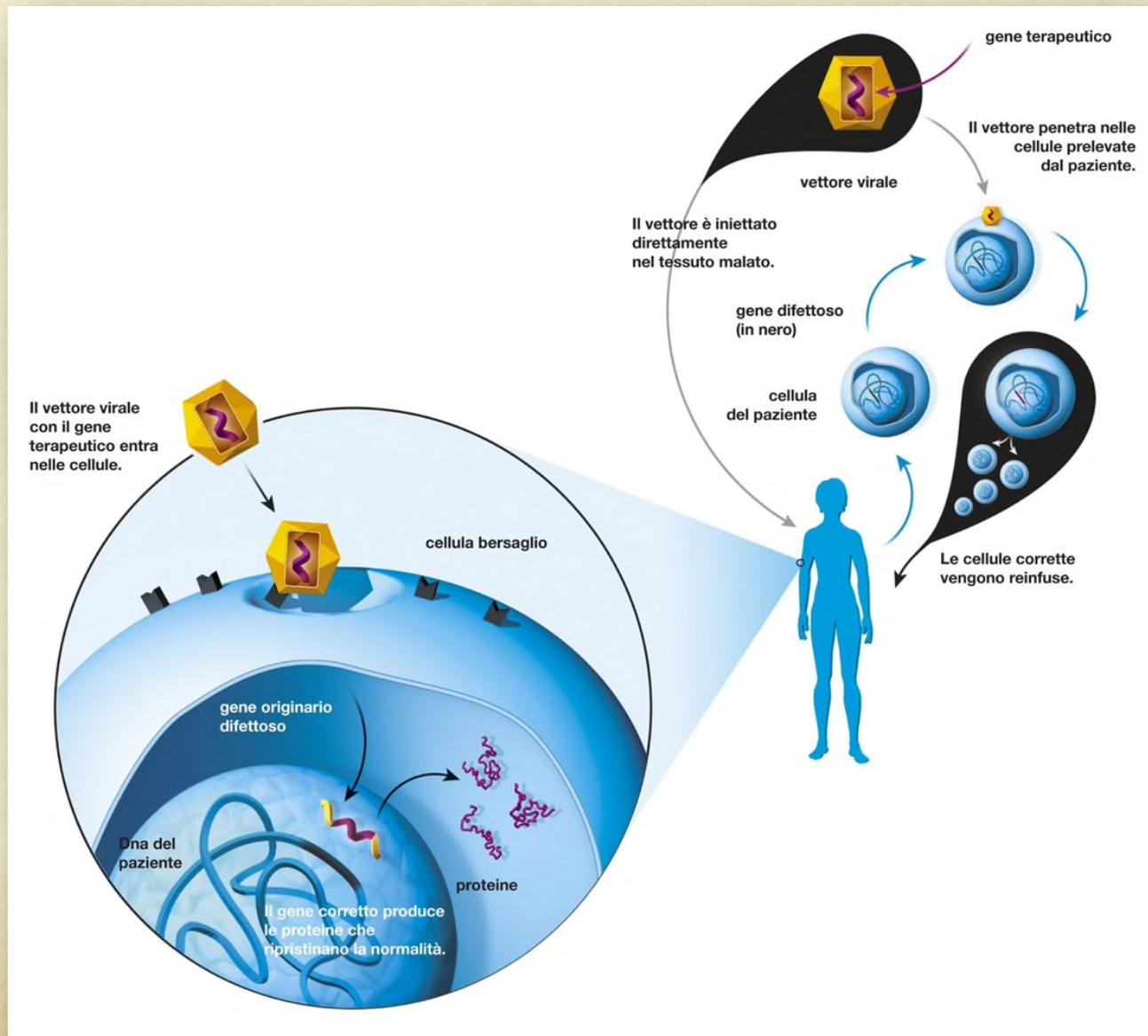
Generic name (trade name)	Origin	Isotype (conjugate)	Target	Approved uses/trials	Initial approval
<b>Unconjugated MAbs</b>					
Rituximab (Rituxan)	Chimeric	IgG1	CD20	Various leukemias and lymphomas	1997
Ofatumumab (Arzerra)	Human (XenoMouse)	IgG1	CD20	CLL/NHL	2009
Obinutuzumab (Gazyva)	Humanized	IgG1	CD20	CLL/NHL	2013
Alemtuzumab (Campath-1H)	Humanized	IgG1	CD52	CLL (no longer in clinical use)	2001
Trastuzumab (Herceptin)	Humanized	IgG1	HER2	Breast and gastric cancer/esophageal	1998
Pertuzumab (Perjeta)	Humanized	IgG1	HER2	Breast/esophageal, neuroendocrine, gastric	2012
Cetuximab (Erbix)	Chimeric	IgG1	EGFR	Colorectal, HNSCC, lung	2004
Panitumumab (Vectibix)	Humanized	IgG2	EGFR	Colorectal/pancreatic	2006
Bevacizumab (Avastin)	Humanized	IgG1	VEGF-A	Colorectal, NSCLC, glioblastoma, RCC, cervical, ovarian	2004
Denosumab (Xgeva)	Human	IgG2	RANKL	GCTB	2010
Ramucirumab (Cyramza)	Humanized	IgG1	VEGFR2	Gastric cancer, NSCLC/HCC, RCC, Breast	2014
Ipilimumab (Yervoy)	Human	IgG1	CTLA-4	Melanoma	2011
Nivolumab (Opdivo)	Human	IgG4	PD-1	Melanoma	2014
Pembrolizumab (Keytruda)	Humanized	IgG4	PD-1	Melanoma/NSCLC, glioblastoma, ovarian, colon, RCC	2014
Dinutuximab (UNITUXIN)	Humanized	IgG1	GD2	High risk neuroblastoma	2015
<b>Immunoconjugates</b>					
Ibritumomab Tiuxetan (Zevalin)	Murine	IgG1 ( <sup>90</sup> Y)	CD20	Non-Hodgkin's lymphoma	2002
Brentuximab vedotin (Adcetris)	Chimeric	IgG1 (MMAE)	CD30	Hodgkin's lymphoma, SALCL	2011
Ado-trastuzumab emtansine (Kadcyla)	Humanized	IgG1 (DM1)	HER2	Breast cancer	2013
Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg)	Humanized	IgG1 (calicheamicin)	CD33	AML	2000 <sup>a</sup>

MAb, monoclonal antibody; IgG, immunoglobulin-G; CLL, Chronic Lymphocytic Leukemia; NSCLC, Non-Small Cell Lung Cancer; <sup>90</sup>Y, yttrium-90; <sup>131</sup>I-Iodine-131; MMAE, monomethyl auristatin E; DM1, Mertansine; HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma; SRE, skeletal-related event; GTCB, giant cell tumor of bone; SALCL, Systemic Anaplastic Large Cell Lymphoma.

<sup>a</sup> Withdrawn in 2010, currently reentered clinical trials for AML in France.



# 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.

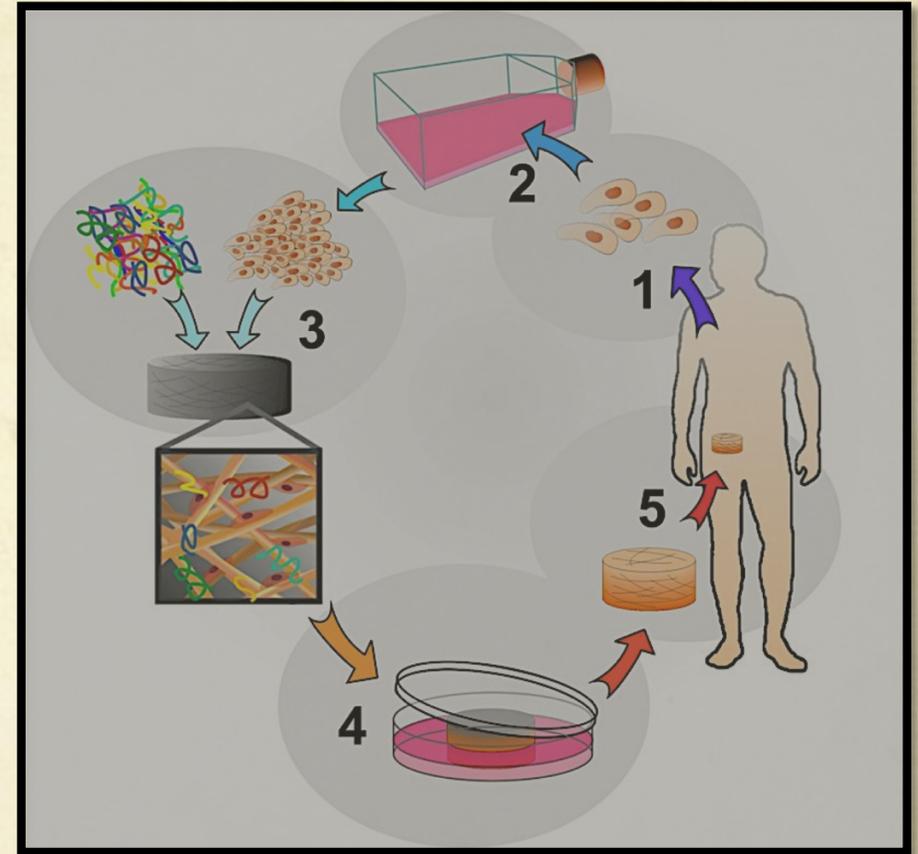
# L'ingegneria tissutale

## 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.

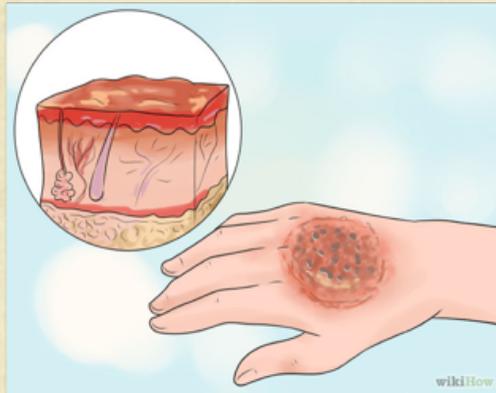
# Tessuti Ingegnerizzati

- ✓ 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

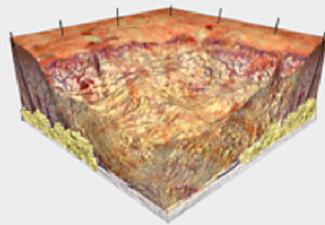
*(estensione limitata ma difficili da guarire)*



# Pelle Ingegnerizzata: cura delle ustioni

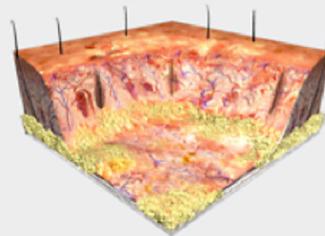
## DAY 0: PRE-TREATMENT

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

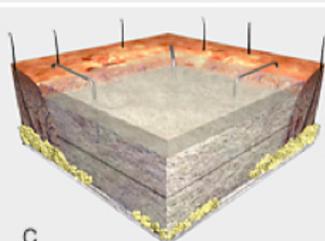
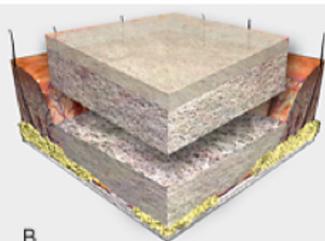
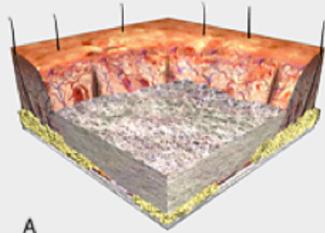
Prepare wound bed using standard methods to ensure wound is free of debris and necrotic tissue. Regardless of how well the wound has been prepared and how healthy it looks, INTEGRA™ Matrix Wound Dressing must not be placed on an existing wound surface. The entire existing wound must be completely excised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



## DAY 1: APPLICATION

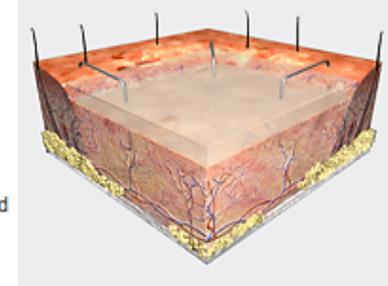
INTEGRA™ Matrix Wound Dressing is applied to the excised wound bed (A). Fluids invade the matrix within minutes of application, adhering it to the wound. The INTEGRA must conform to and contact the wound surface. It can be affixed with sutures, staples, or any suitable alternative.

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



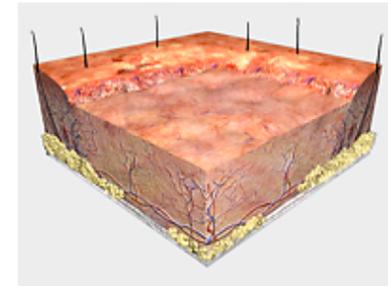
## DAY 7-14: NEW DERMIS FORMATION

Dermal cells begin migrating into the matrix and establish a new vascular network. As healing progresses, the collagen (protein) in the INTEGRA Template is replaced by collagen organically produced by new dermal skin cells.



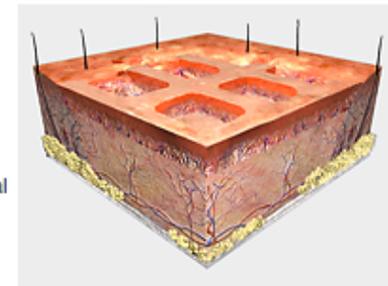
## DAY 21+: SILICONE REMOVAL

Upon formation of a new dermal layer, the INTEGRA silicone layer is removed. The INTEGRA collagen template biodegrades and is absorbed into the body, leaving new dermal skin.



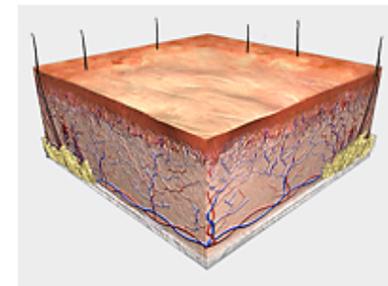
## DAY 21+: EPIDERMAL AUTOGRAFT

A thin 0.004 – 0.006 in. (0.1016 - 0.1524 mm) epidermal autograft is applied over the new dermal skin.

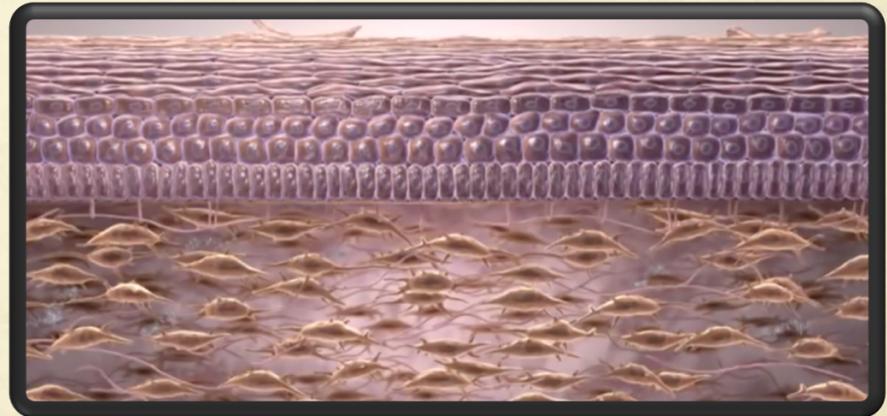
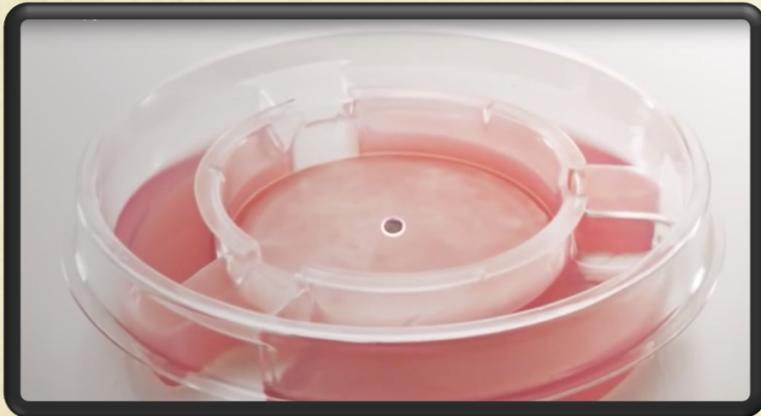
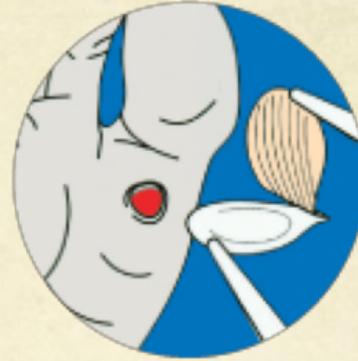


## DAY 25-56: REGENERATED SKIN

Successful engraftment completes the procedure yielding a permanent and lasting wound closure.



# Pelle Ingegnerizzata: l'ulcera diabetica

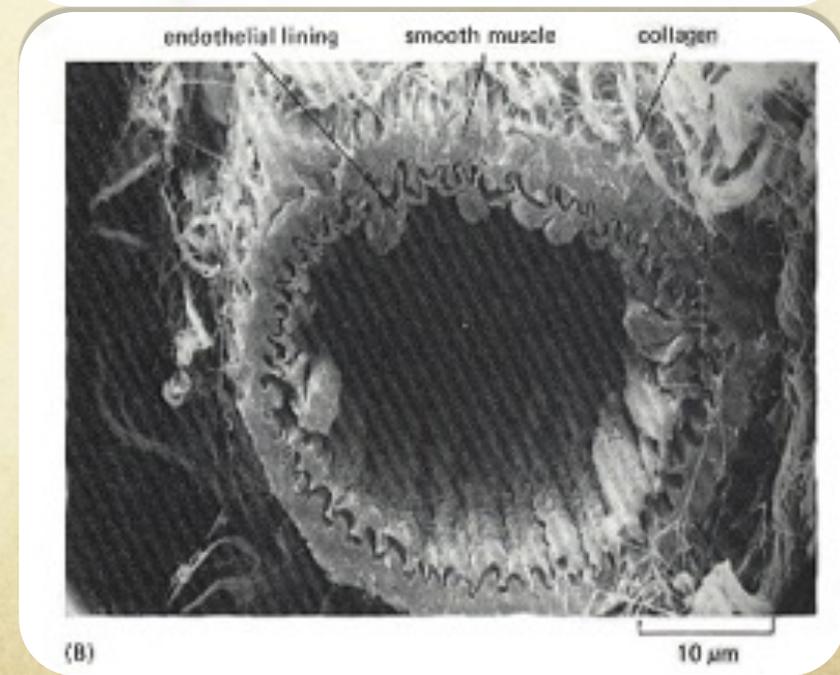
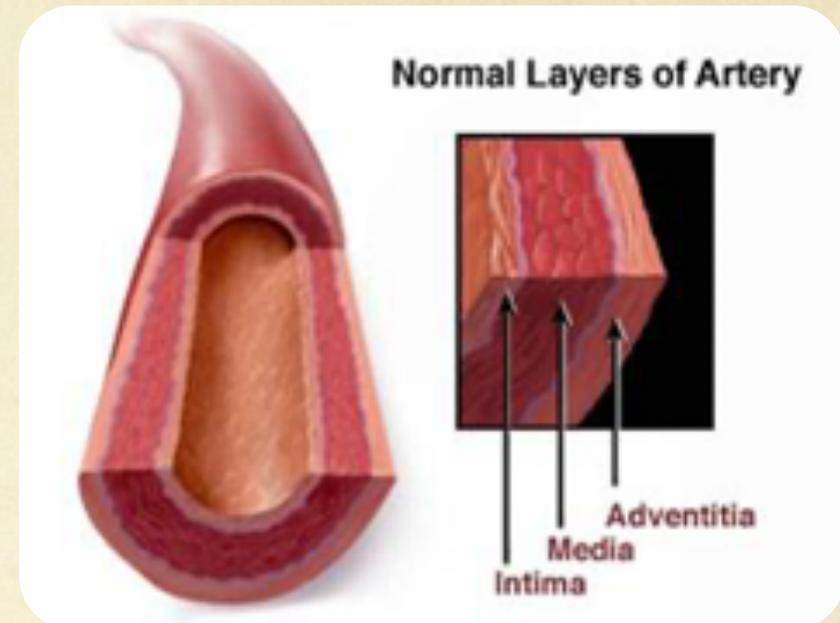


# Vasi sanguigni

- **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)

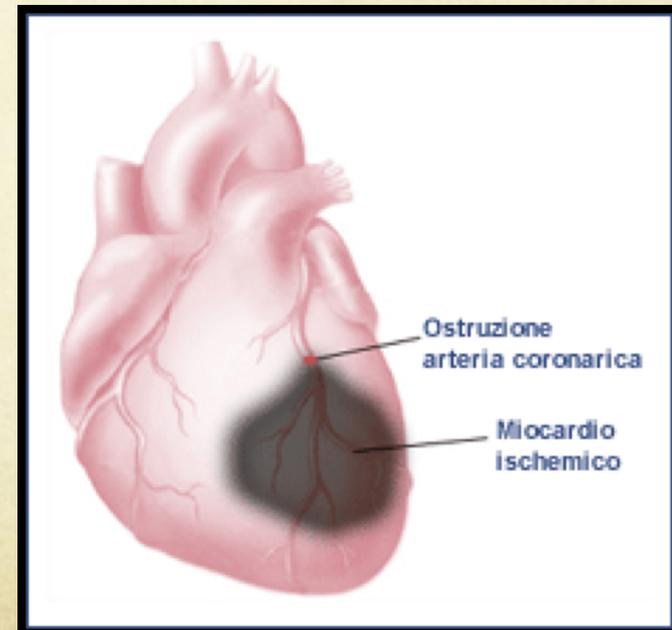
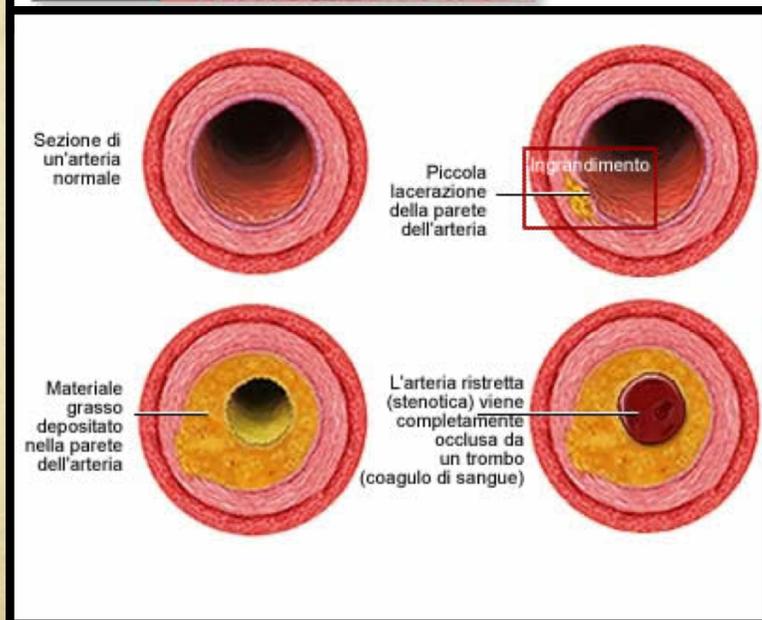
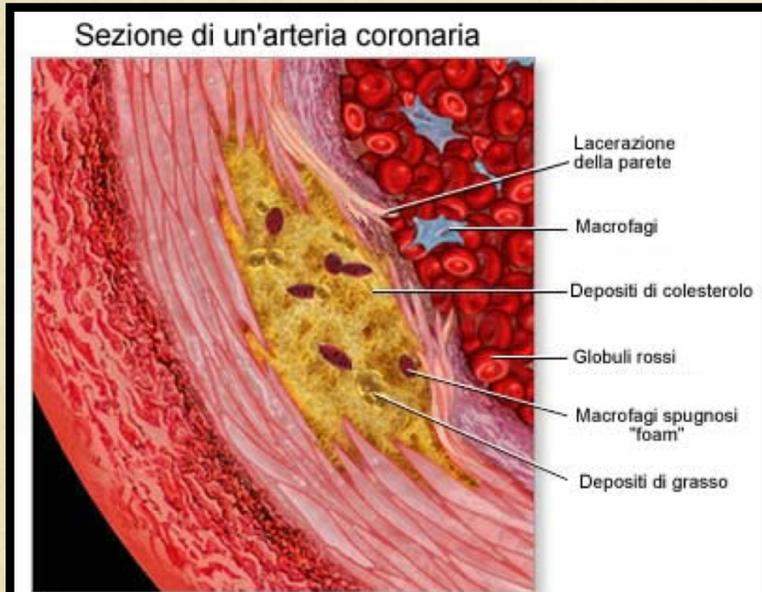
## ORGANIZZAZIONE:

- ✓ **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

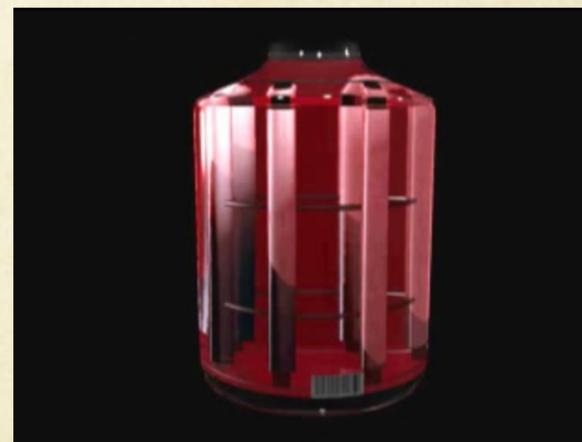
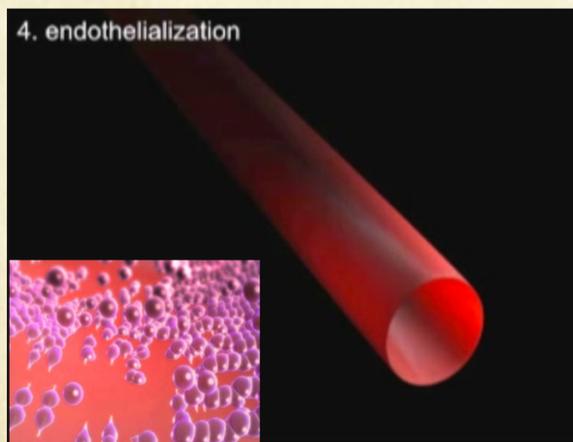
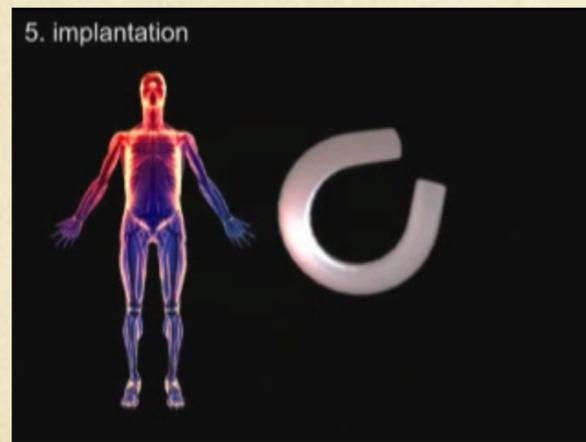
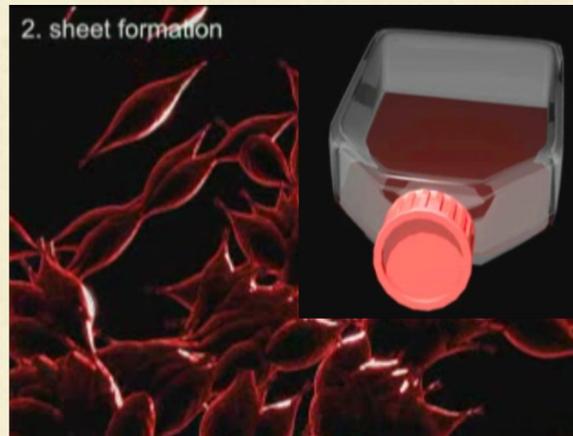
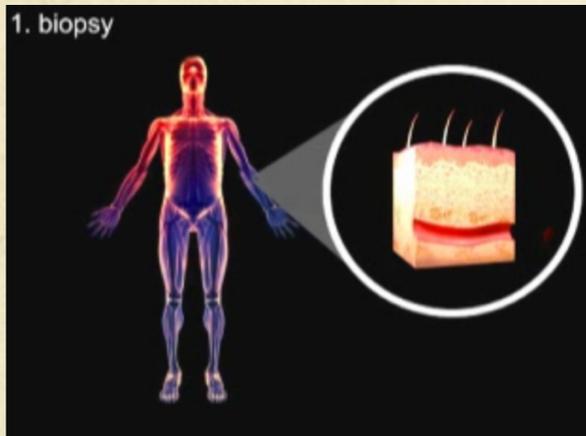


# Vasi sanguigni

- 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! 😊



*“ Lo scienziato nel suo laboratorio non è solo un tecnico,  
è anche un bambino davanti a fenomeni della Natura  
che lo affasciano come un racconto di fate ”*

*Marie Curie*