

ZANICHELLI

Fabio Fanti

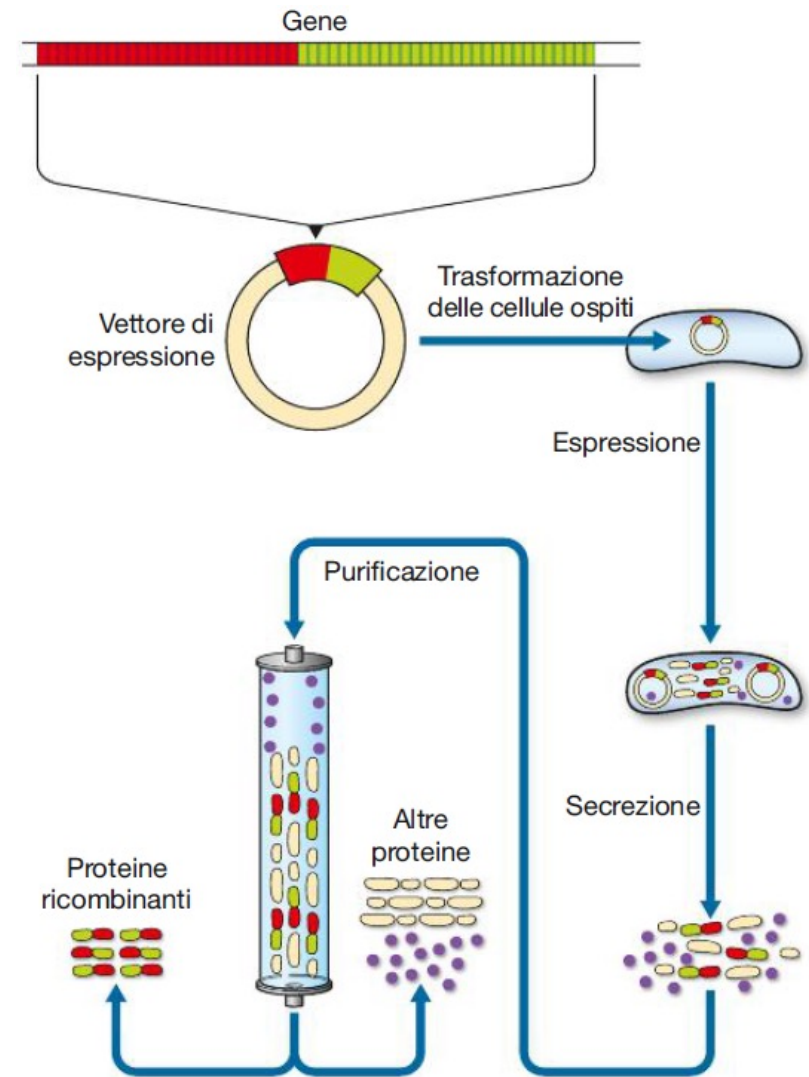
Biologia, microbiologia e tecnologie di controllo sanitario

Produzioni
biotecnologiche
in ambito sanitario

Sperimentazione di
nuovi farmaci, composti
guida e farmacovigilanza

Produzione biotecnologica di proteine umane /1

1. Si individua la **sequenza nucleotidica** che contiene l'informazione per la sintesi della proteina di interesse
2. La sequenza nucleotidica è inserita in una **cellula coltivabile** tramite un **vettore**
3. Questa cellula diventa il «**sistema di espressione**» per fabbricare la proteina
4. La **proteina** è estratta dal sistema di coltura e purificata



Produzione biotecnologica di proteine umane /2

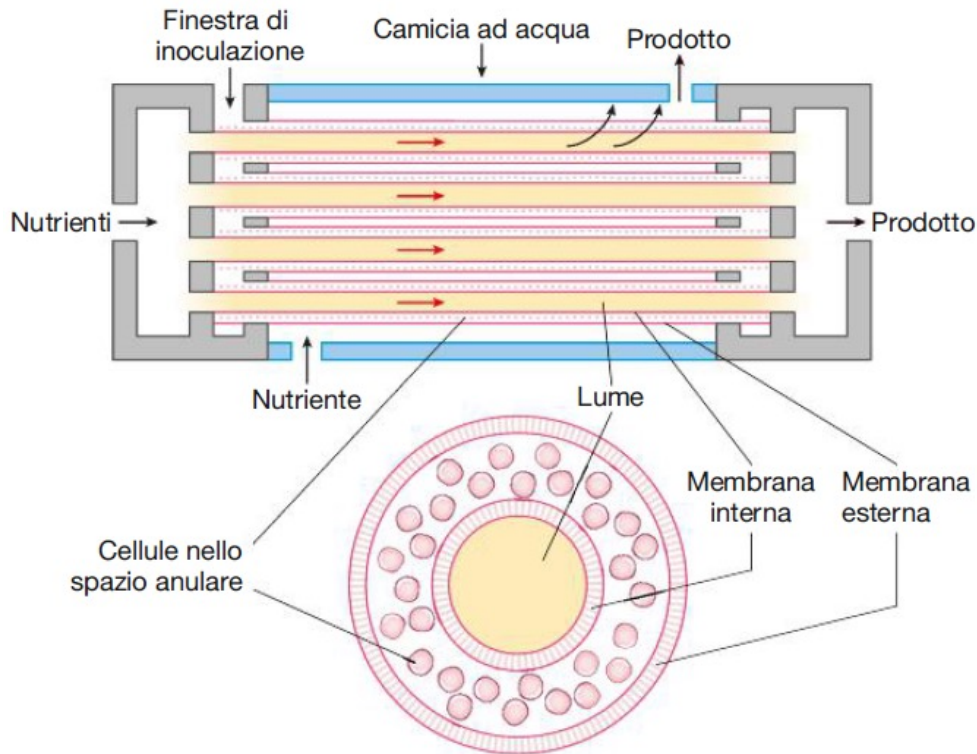
Sistemi di espressione: si utilizzano cellule procariotiche o eucariotiche. Attenzione: i batteri non possono produrre proteine glicosilate, per le quali bisogna ricorrere a cellule di mammifero.

Le **colture cellulari** si effettuano in fermentatori o bioreattori ad agitazione meccanica o pneumatica (*air lift*), a perfusione a fibre cave, a letto fisso, con tecnica continua, discontinua o discontinua con rifornimento (*feed-batch*).

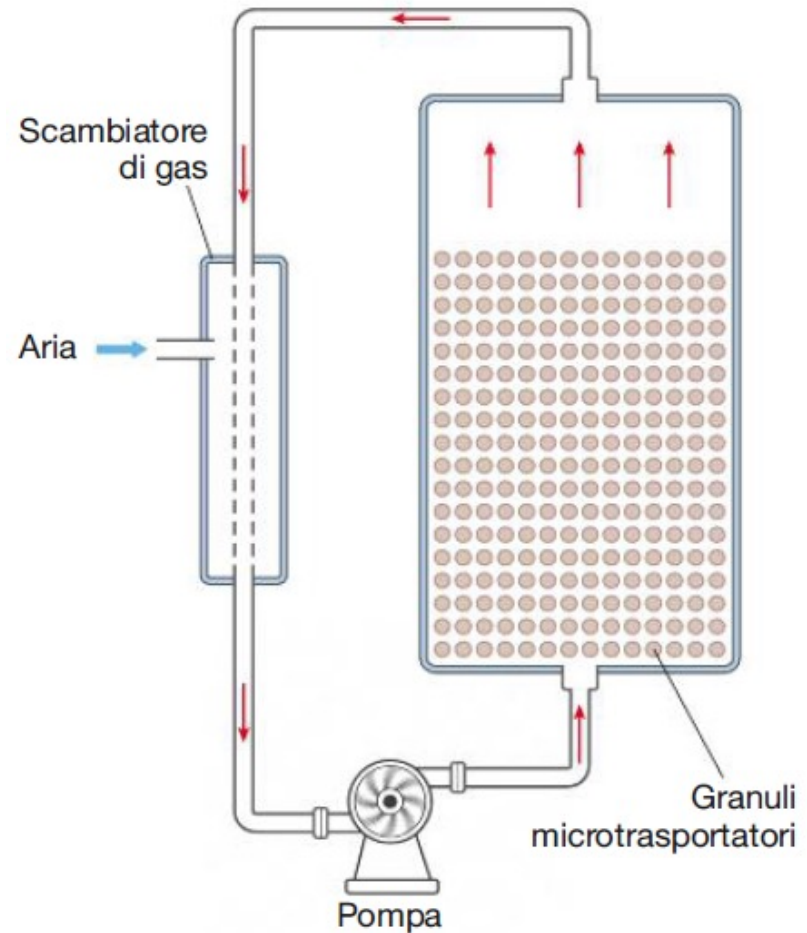
Le cellule animali devono essere esenti da qualsiasi tipo di **contaminazione** (es. da virus e pirogeni).

Le proteine devono essere sterili, perciò si lavora in **ambiente asettico**.

Produzione biotecnologica di proteine umane /3



Bioreattore a perfusione con fibre cave.



Bioreattore a letto fisso.

Produzione biotecnologica di proteine umane /4

Gli **eccipienti** sono qualsiasi sostanza diversa dal principio attivo (es. agenti che migliorano la solubilità, sistemi tampone, antiossidanti e conservanti).

Le proteine vengono **liofilizzate** (= passaggio diretto dallo stato solido a quello aeriforme).

La **via di somministrazione** può essere parenterale (tramite ago) o orale.

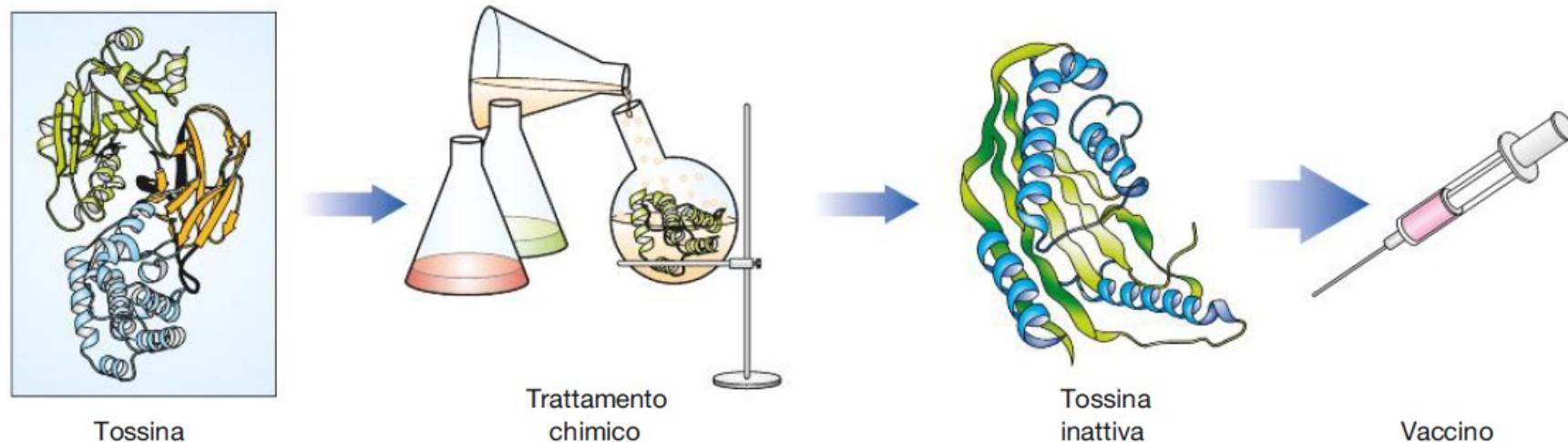
Una volta prodotta la proteina si procede con la **scale-up**, ovvero il trasferimento di reazioni complesse su scala industriale.

Produzione delle varie tipologie di vaccini /1

I **vaccini** sono sostanze antigeniche che inducono nell'organismo una reazione immunitaria specifica, che è in grado di prevenire le conseguenze di un'ulteriore aggressione da parte degli stessi antigeni contro cui ci si è vaccinati (scopo profilattico).

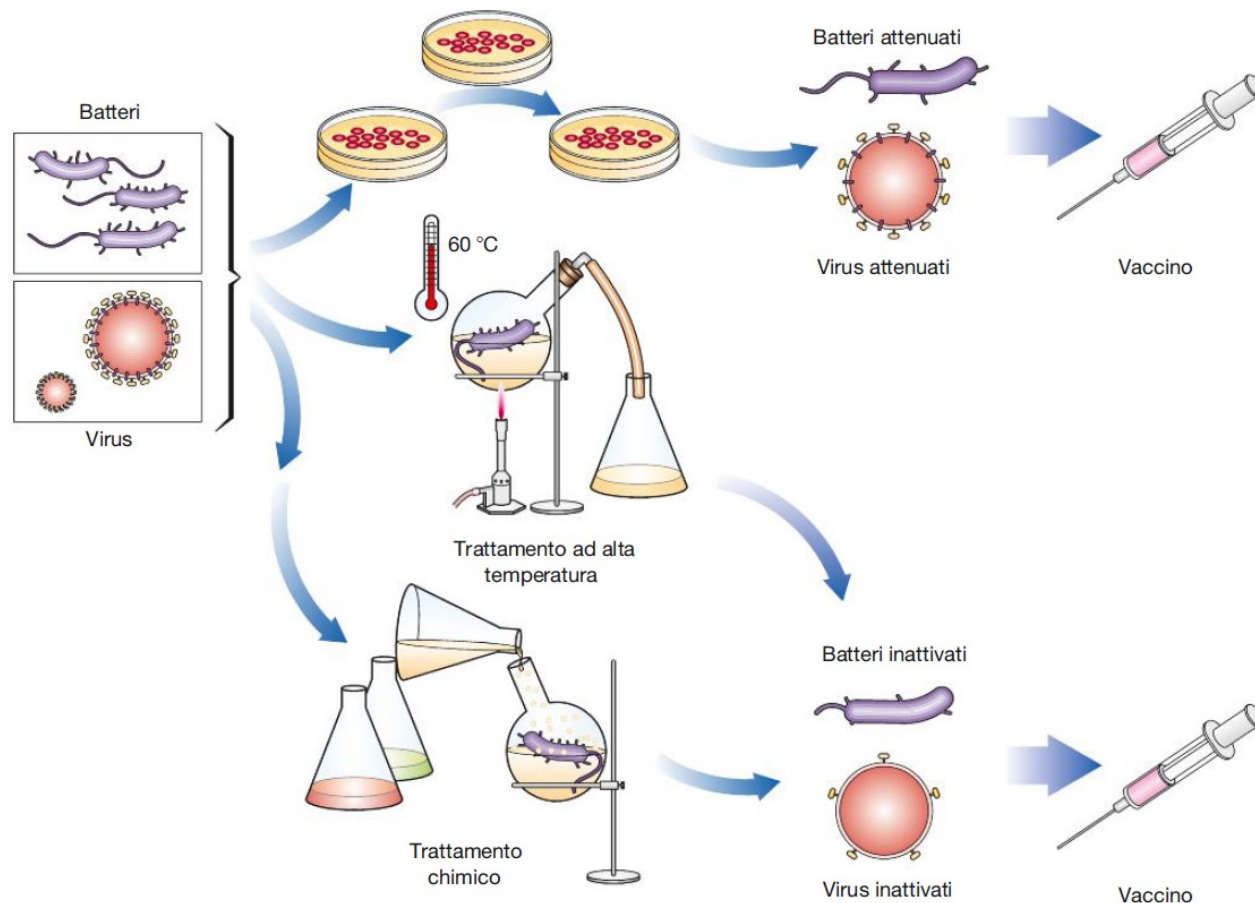
Si possono ottenere da diverse fonti.

Vaccini tossoidi:



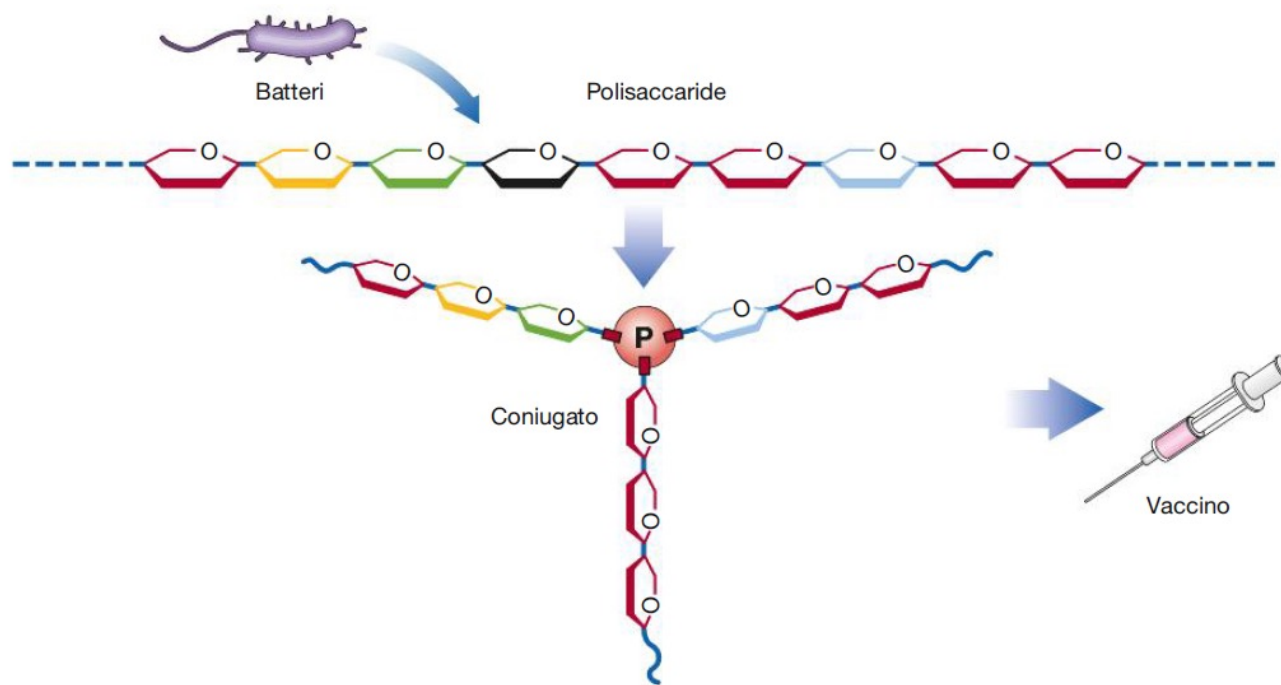
Produzione delle varie tipologie di vaccini /2

Vaccini da microrganismi attenuati e inattivati:



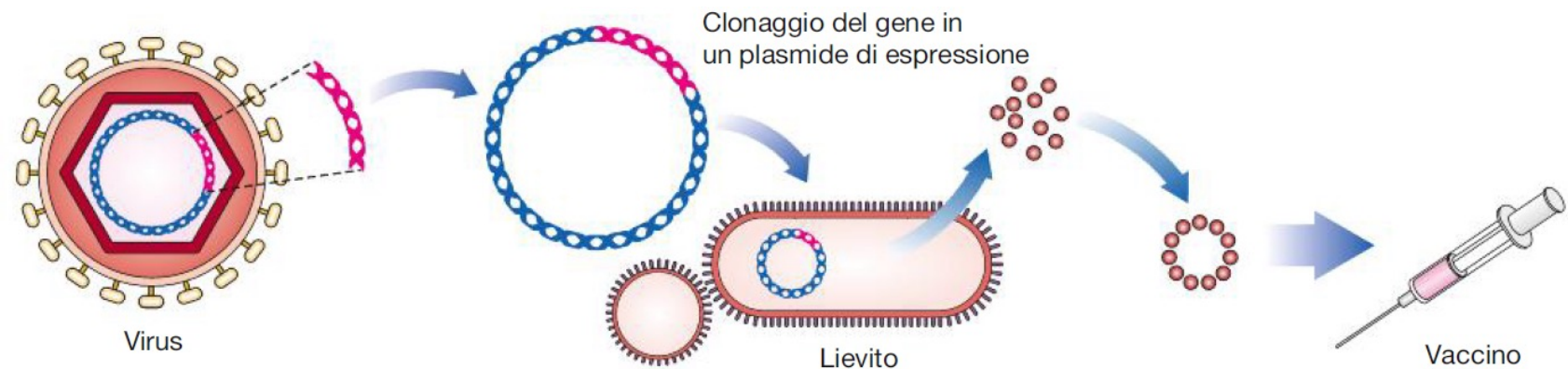
Produzione delle varie tipologie di vaccini /3

Vaccini polisaccaridici:

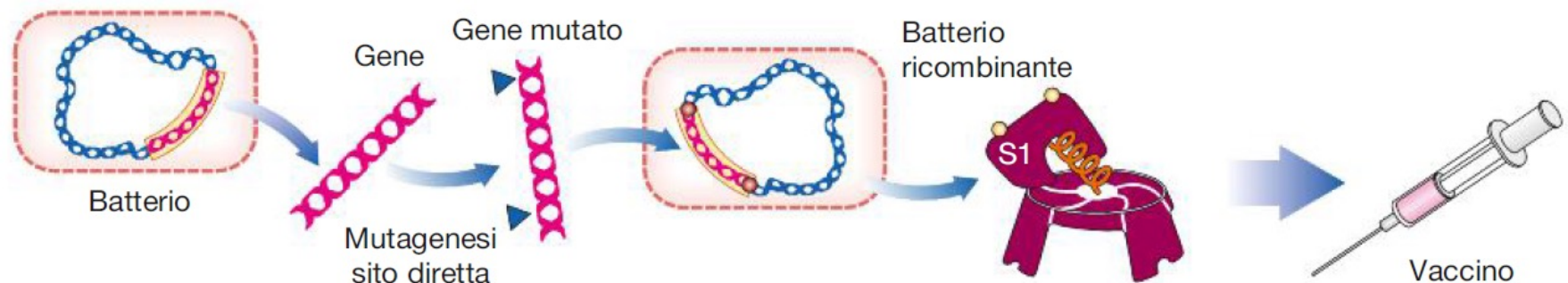


Produzione delle varie tipologie di vaccini /4

Vaccino ricombinante per l'epatite B:

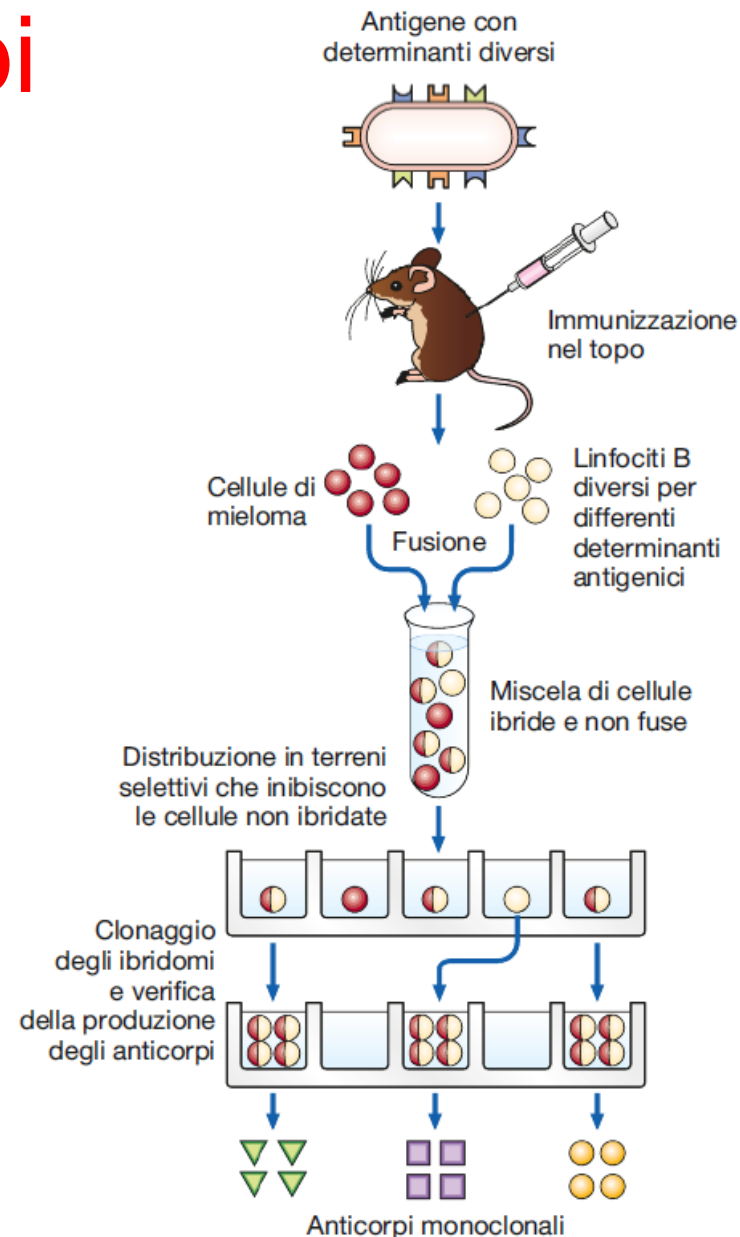


Vaccino ricombinante per la pertosse:



Produzione di anticorpi monoclonali /1

Gli **anticorpi monoclonali** sono prodotti da un unico clone cellulare e si legano in modo selettivo e specifico ai corrispondenti antigeni, molecole non-self (estranee all'organismo) che ne hanno indotto la produzione in seguito alla sensibilizzazione del sistema immunocompetente, innescando la reazione immunitaria.

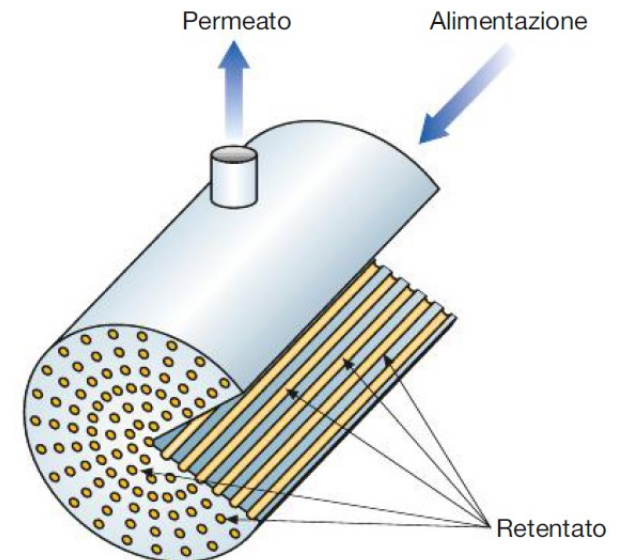


Produzione di anticorpi monoclonali /2

Gli anticorpi monoclonali sono impiegati in diversi ambiti:

- come **mezzo diagnostico**: vengono marcati con reagenti (es. che sviluppano luminescenza o radioattività) in modo da identificare antigeni virali o batterici e cellule tumorali, con tecniche ELISA e di immunofluorescenza
- come sistemi di separazione dei componenti di una miscela (**immunoseparazione**)
- come vettori (**carrier**) di farmaci verso cellule tumorali

La coltivazione viene effettuata all'interno di un **bioreattore a fibre cave**.



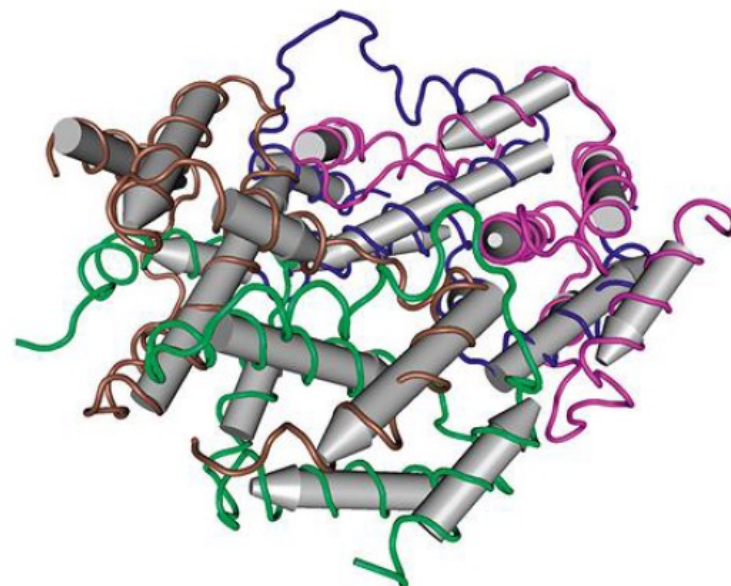
Bioreattore a fibre cave.

Produzione e impiego degli interferoni

Gli **interferoni** sono proteine specie-specifiche prodotte dall'organismo in risposta a un'infezione virale.

Nell'organismo umano sono prodotti gli interferoni α , β e γ , rispettivamente da leucociti, fibroblasti e linfociti T attivati da una stimolazione antigenica.

Impiegando le tecniche di ingegneria genetica, è possibile produrre **interferoni ricombinanti** inserendo e facendo esprimere il gene umano che codifica per la loro sintesi in cellule di *Escherichia coli*.



Struttura dell'interferone γ umano.

Produzione di ormoni a scopo terapeutico /1

Gli **ormoni** sono prodotti dalle ghiandole endocrine e, attraverso il circolo ematico, raggiungono gli specifici organi bersaglio. Dal punto di vista chimico, si distinguono **ormoni polipeptidici** e **ormoni steroidei**.

Tra gli ormoni polipeptidici troviamo:

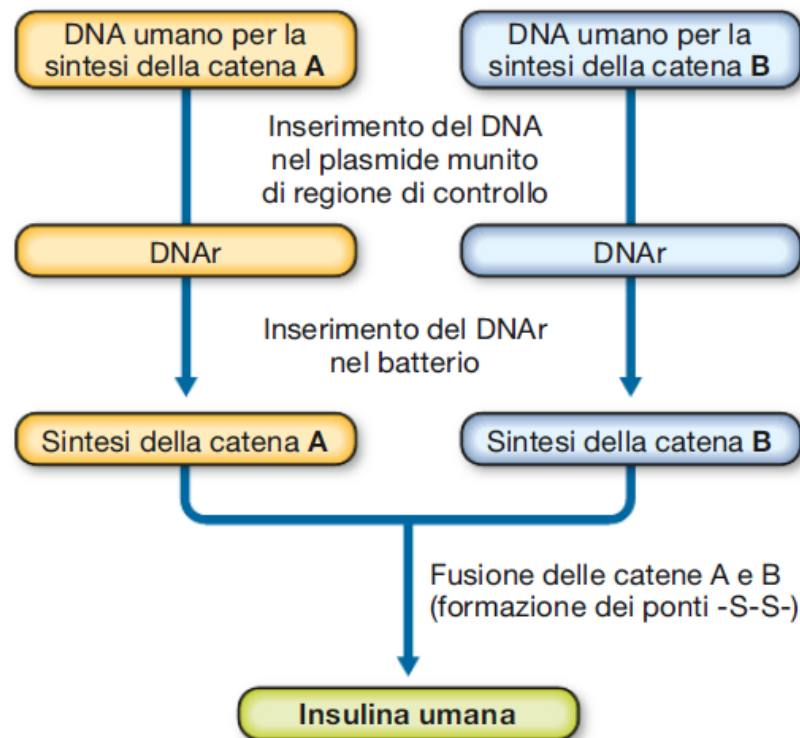
Somatostatina:

- catena di 14 aminoacidi
- secreta dall'ipotalamo
- regola la produzione di altri ormoni, fra cui l'insulina e l'HGH
- si ottiene con la tecnologia del DNA ricombinante

Produzione di ormoni a scopo terapeutico /2

Insulina:

- secreta dalle cellule β delle isole di Langerhans della frazione endocrina del pancreas
- permette il trasferimento del glucosio dal sangue all'interno delle cellule (la sua carenza provoca l'innalzamento della glicemia)
- struttura chimica: due catene polipeptidiche unite da ponti disolfuro

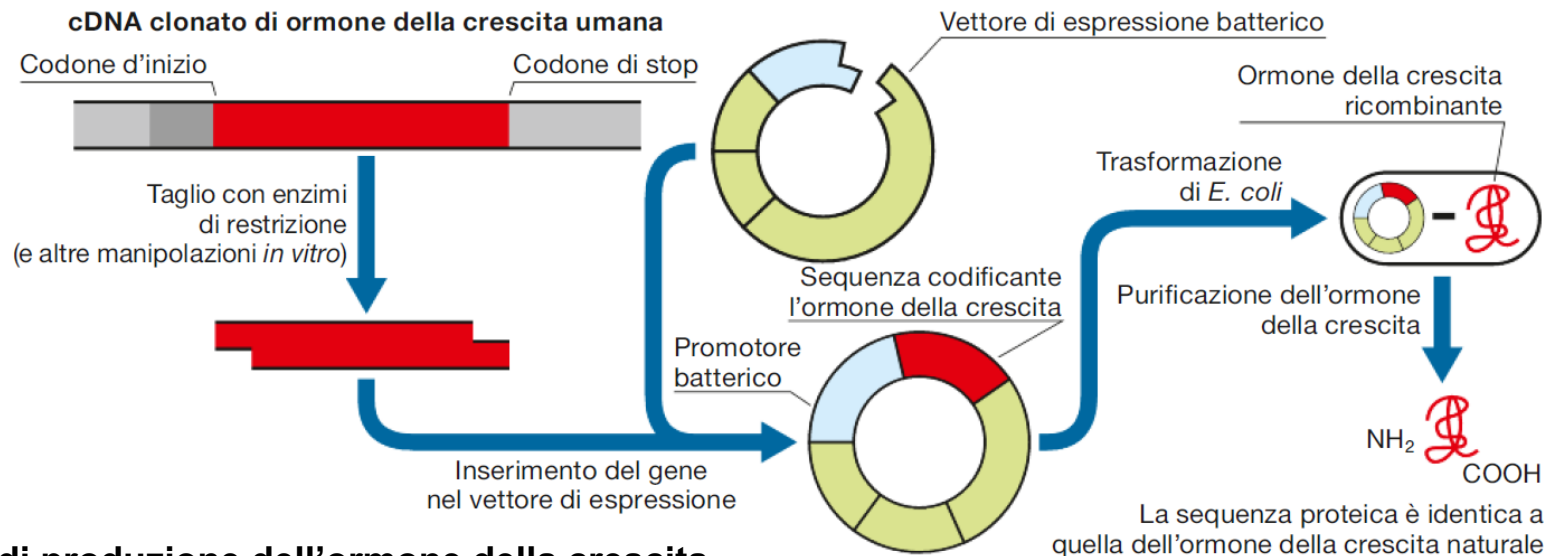


Passaggi per la sintesi dell'insulina.

Produzione di ormoni a scopo terapeutico /3

Ormone della crescita (HGH) o somatotropina:

- catena di 121 aminoacidi
- secreto dal lobo anteriore dell'ipofisi
- regola l'accrescimento corporeo (agisce sull'allungamento delle ossa lunghe)



Schema di produzione dell'ormone della crescita.

I fattori di crescita emopoietici

L'**emopoiesi** è il processo di maturazione che permette alle cellule immature del midollo osseo di diventare cellule ematiche funzionali.

La produzione, la crescita e la sopravvivenza delle cellule ematiche richiedono la presenza e l'intervento di **fattori emopoietici** specifici (denominati in base alle cellule bersaglio).

Eritropoietina:

- ormone secreto dai reni
- formato da 165 aminoacidi
- esplica la propria funzione biologica solo se glicosilato
- funzione di eritropoiesi: promuove nel midollo osseo la formazione e la maturazione delle cellule staminali eritropoietiche in globuli rossi o eritrociti

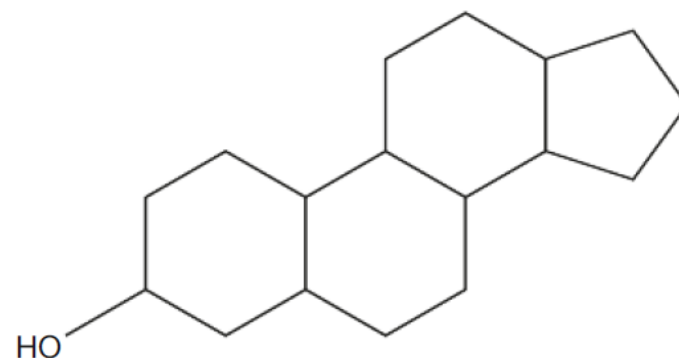
Bioconversioni nelle sintesi chemio-enzimatiche

Per **bioconversione** si intende una sintesi chimica resa più veloce dall'intervento di biocatalizzatori.

Bioconversioni intervengono nella produzione della vitamina C e in quella degli ormoni steroidei.

Ormoni steroidei:

- presentano una formula di base comune, riconducibile al ciclopentanoperidrofenantrene
- le diverse funzionalità sono da attribuirsi ai vari sostituenti dell'anello



Struttura del ciclopentanoperidrofenantrene.

Vitamine: processi di produzione e funzioni

Le **vitamine** sono sostanze organiche indispensabili alla vita degli organismi. Svolgono funzioni di mantenimento dell'integrità delle membrane biologiche e di bioregolazione metabolica. Possono essere idrosolubili (B1 , B2 , B12 , C) o liposolubili (A, D, E, K).

Produzione della vitamina C: prevede cinque step di sintesi chimica e una biotrasformazione microbiologica con l'intervento del microrganismo *Gluconobacter oxydans*, che effettua la bioconversione selettiva di ossidazione del D-sorbitolo a L-sorbosio (processo Reichstein).

Produzione di antibiotici naturali e semisintetici

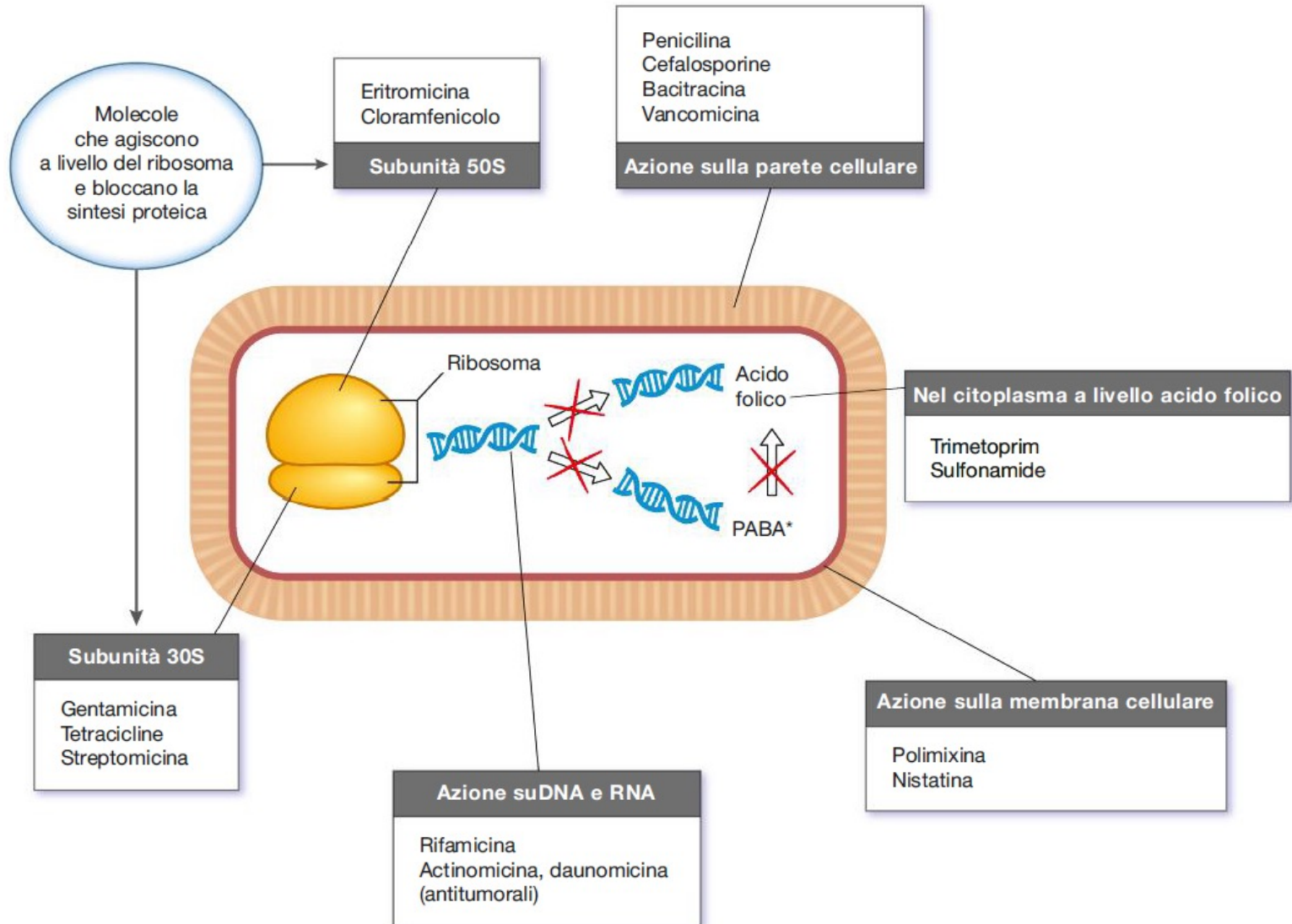
Gli **antibiotici** sono molecole prodotte da microrganismi, attive nei confronti di altri microrganismi di cui inibiscono lo sviluppo.

L'azione antimicrobica di un antibiotico può esprimersi come:

- eliminazione dei microrganismi con un effetto microbicide
- blocco della loro riproduzione con effetto microbiostatico

Accanto agli **antibiotici naturali** è possibile ottenere **antibiotici semisintetici**, che derivano da modifiche del prodotto microbico originario effettuate artificialmente in laboratorio, sostituendo gruppi chimici o catene laterali nella molecola di base.

Meccanismo d'azione degli antibiotici



Produzione di penicilline e cefalosporine /1

La **penicillina** è prodotta da colture di *Penicillium chrysogenum*.

Gli **antibiotici β -lattamici** sono caratterizzati dalla presenza di:

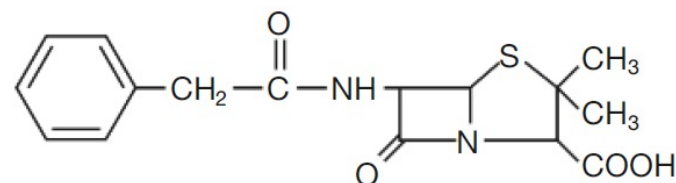
- *anello β -lattamico*, che è indispensabile per l'attività antimicrobica
- *anello tiazolidinico*, che deriva dagli aminoacidi valina e cisteina
- *catena laterale*, la cui struttura differenzia le varie penicilline

L'unione fra anello tiazolidinico e anello β -lattamico dà origine all'**acido 6-amminopenicillanico (6-APA)**, molecola base delle penicilline semisintetiche.

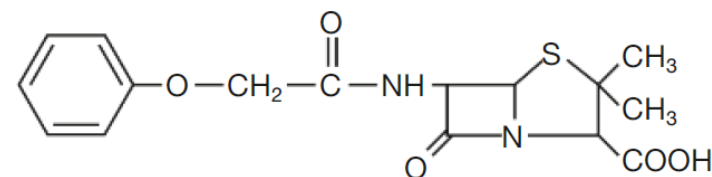
Produzione di penicilline e cefalosporine /2

Le **penicilline naturali** sono:

- penicillina G (benzilpenicillina)



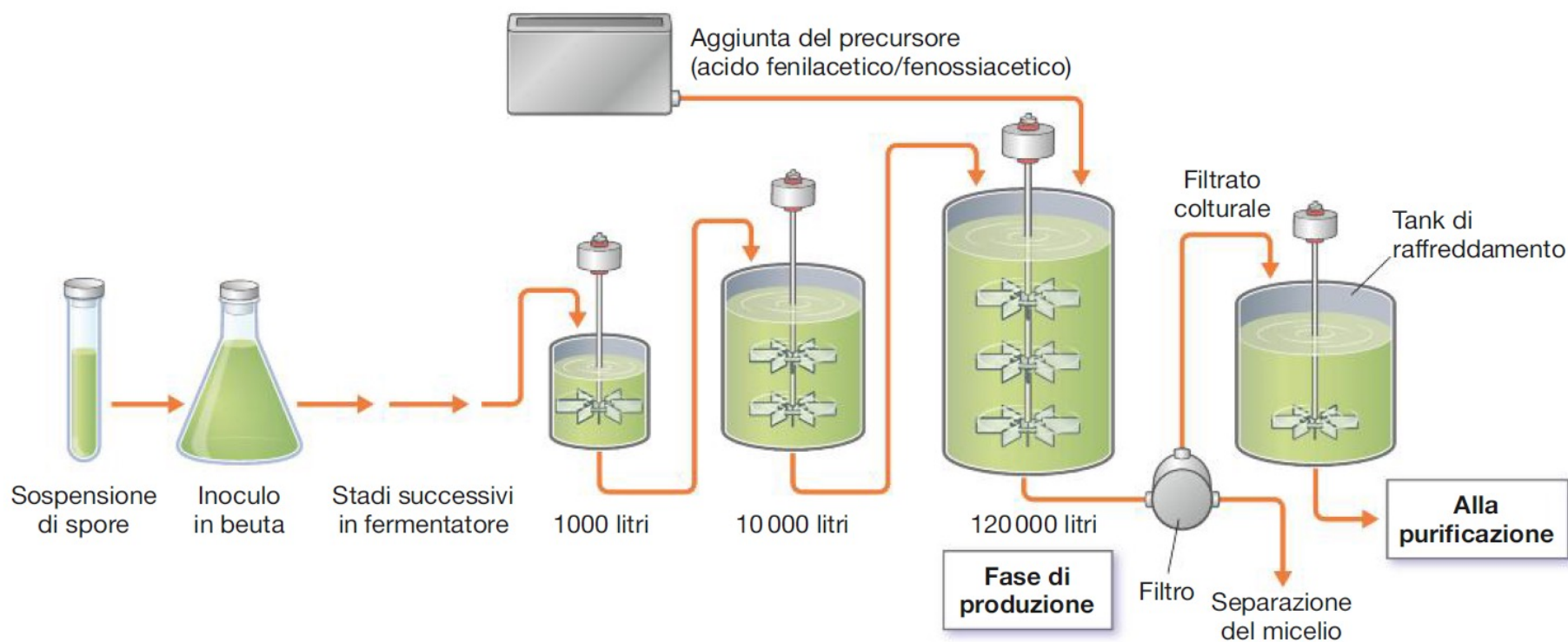
- penicillina V (fenossimetilpenicillina)



Le **penicilline semisintetiche** sono prodotte a partire da penicillina G previo distacco della catena laterale a opera dell'enzima penicillina acilasi con formazione di acido 6-aminopenicillanico, che costituisce la struttura di base. È poi aggiunta per sintesi chimica una diversa catena laterale.

Produzione di penicilline e cefalosporine /3

Il processo di produzione delle penicilline:

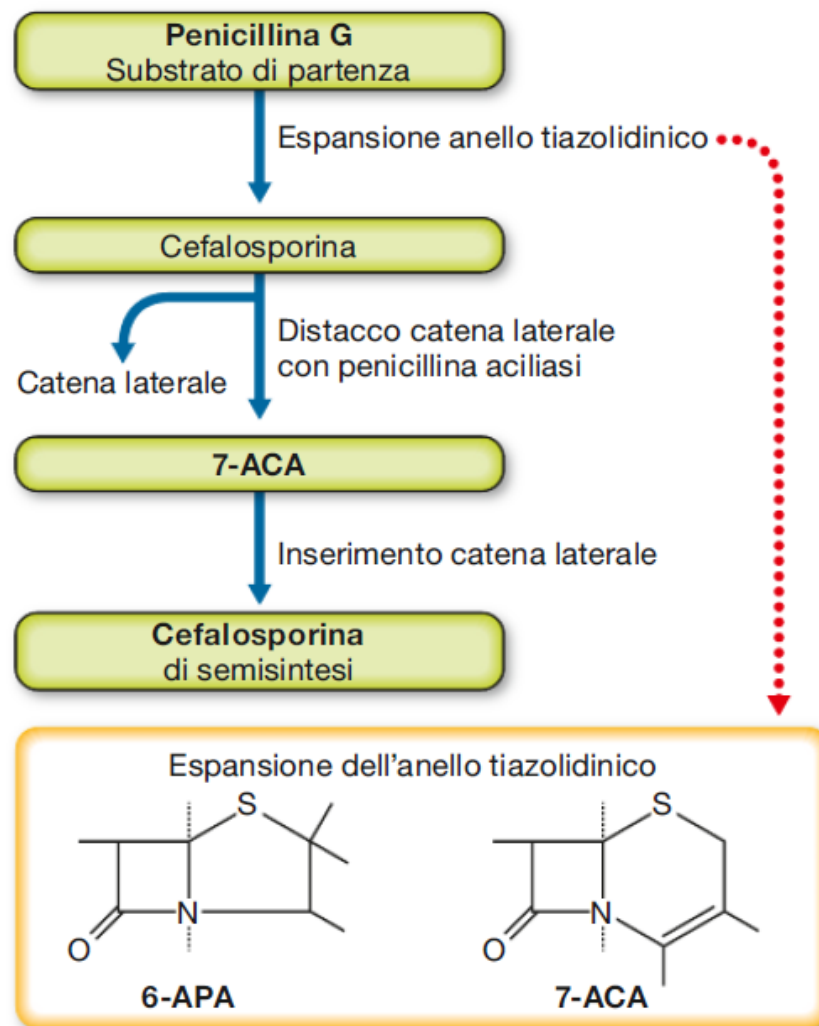


Produzione di penicilline e cefalosporine /4

Le **cefalosporine** hanno uno spettro d'azione più ampio delle penicilline e un minor grado di tossicità.

Le **cefalosporine naturali** sono prodotte con procedura analoga a quella delle penicilline naturali.

Le **cefalosporine semisintetiche** sono prodotte da cefalosporina C o anche da penicillina G e V.



Produzione di cefalosporine e di 7-ACA partendo da 6-APA.

Introduzione alla terminologia farmacologica

La **farmacologia** studia le interazioni fra sostanze di varia natura e i sistemi biologici per valutarne possibili applicazioni terapeutiche.

Il **principio attivo** è una sostanza dotata di attività biologica in senso positivo (terapeutico) o negativo (tossico).

Gli **eccipienti** sono tutte le sostanze diverse dal principio attivo presenti nella composizione di un farmaco.

La **forma farmaceutica** è la forma in cui il farmaco è presentato (es. compresse, sciroppi ecc).

Farmacocinetica: dall'assorbimento all'eliminazione /1

La **farmacocinetica** studia i meccanismi con i quali un farmaco è assorbito, distribuito, biotrasformato ed eliminato dall'organismo.

1. L'assorbimento riguarda la velocità e l'entità del trasferimento di un farmaco dal luogo di somministrazione verso l'organo bersaglio. Il passaggio attraverso le membrane può avvenire mediante diffusione passiva (secondo gradiente) oppure per trasporto attivo (contro gradiente) mediante carrier.

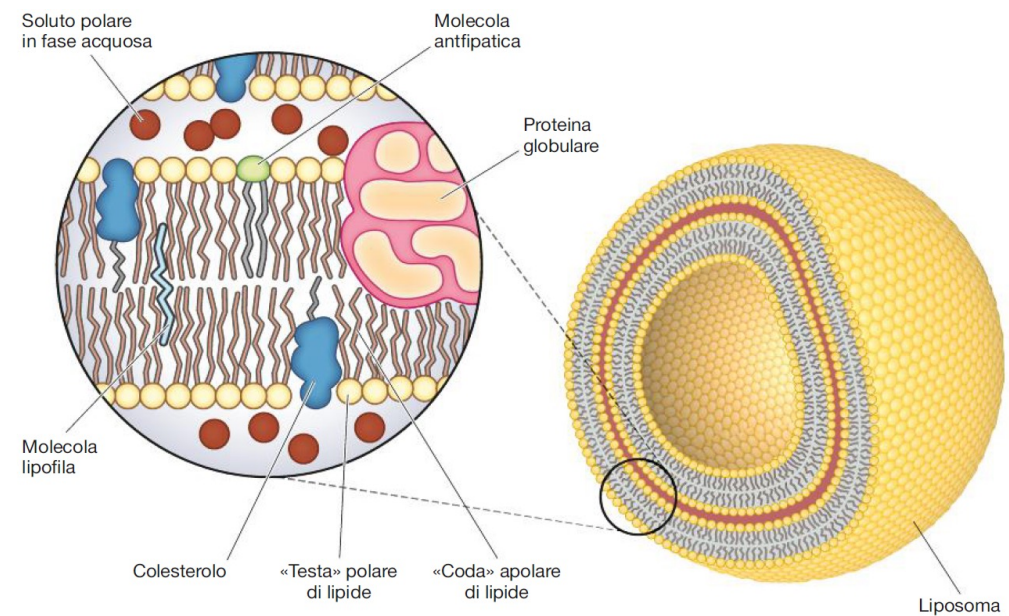
2. La via di somministrazione può essere:

- enterale: ingestione orale o sublinguale, introduzione rettale
- parenterale: iniezione sottocutanea, intramuscolare, endovenosa
- applicazione topica: sulle mucose, sulla cute, nell'occhio.

Farmacocinetica: dall'assorbimento all'eliminazione /2

Altri metodi di somministrazione si avvalgono di:

- **liposomi:** vescicole di natura fosfolipidica che contengono il farmaco in soluzione acquosa
- **microsfere di polimeri biodegradabili**
- **stent:** struttura tubulare che viene inserita per mezzo di un catetere in un'arteria
- **impianti protetti a rilascio prolungato**

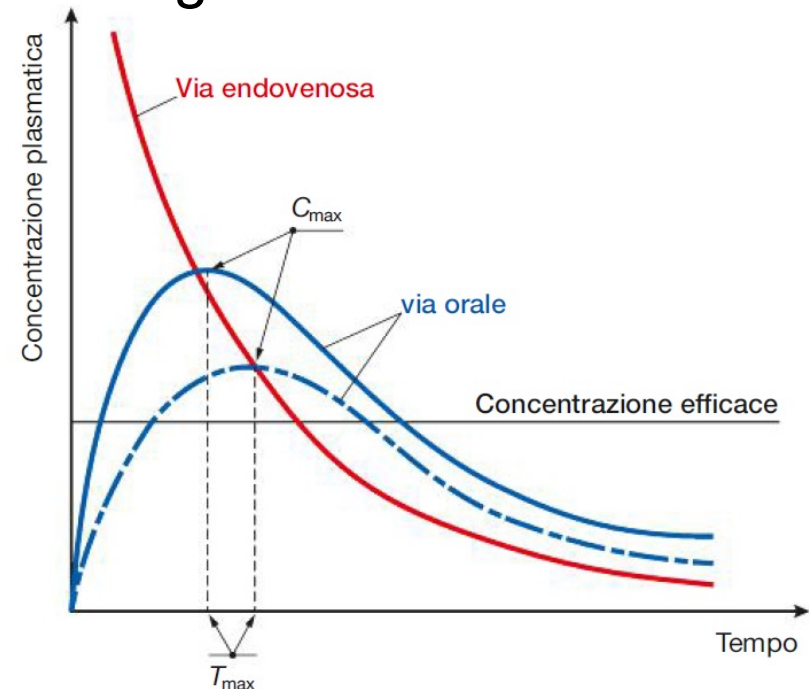


Liposoma multilamellare.

Farmacocinetica: dall'assorbimento all'eliminazione /3

La **biodisponibilità** indica la quota di principio attivo che effettivamente è reso disponibile nella circolazione sanguigna o linfatica, quindi è in grado di giungere integro ai siti recettori delle cellule bersaglio.

L'area sottesa alla curva concentrazione/ tempo è detta **AUC** (*area under the curve*): rappresenta la concentrazione del farmaco nell'organismo in un determinato intervallo temporale.

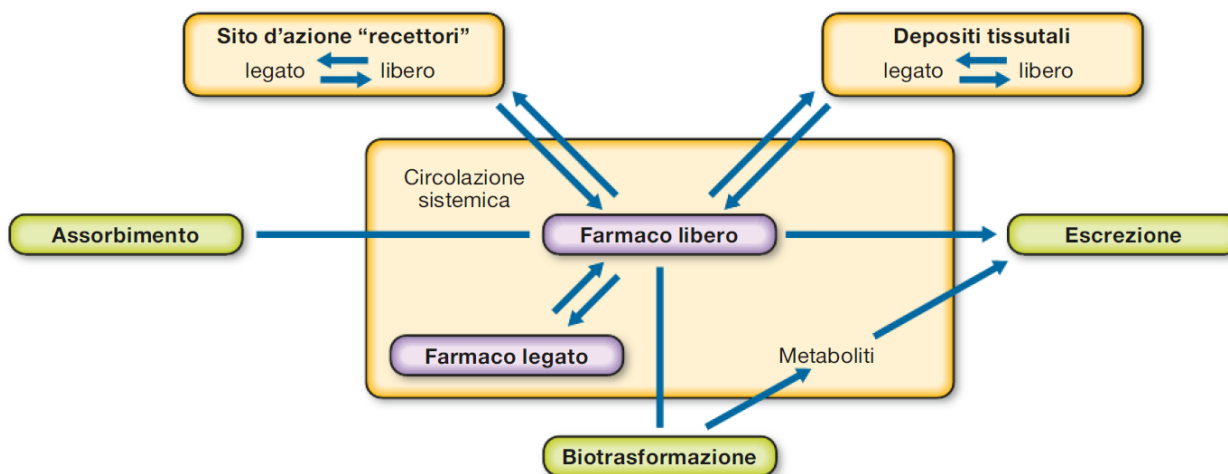


Profilo concentrazione/tempo di un farmaco somministrato per via endovenosa (linea rossa) o in due formulazioni di farmaco (linee blu) somministrate per vie diverse (es. orale).

Farmacocinetica: dall'assorbimento all'eliminazione /4

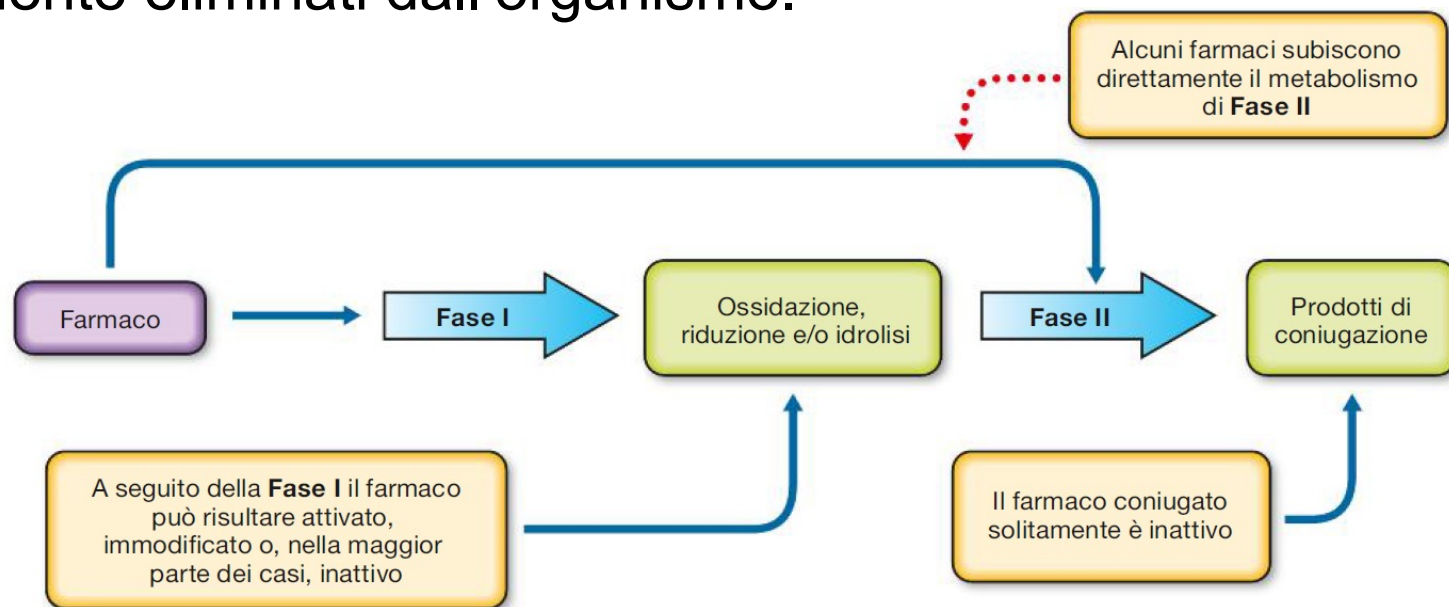
3. La distribuzione riguarda la velocità e i meccanismi con cui il farmaco passa dai capillari sanguigni agli spazi intracellulari e di qui all'interno delle cellule.

I **siti di deposito** sono siti in cui possono accumularsi determinati farmaci e che possono anche funzionare da riserva del farmaco per prolungarne gli effetti (es. tessuto adiposo in cui si depositano i composti liposolubili).



Farmacocinetica: dall'assorbimento all'eliminazione /5

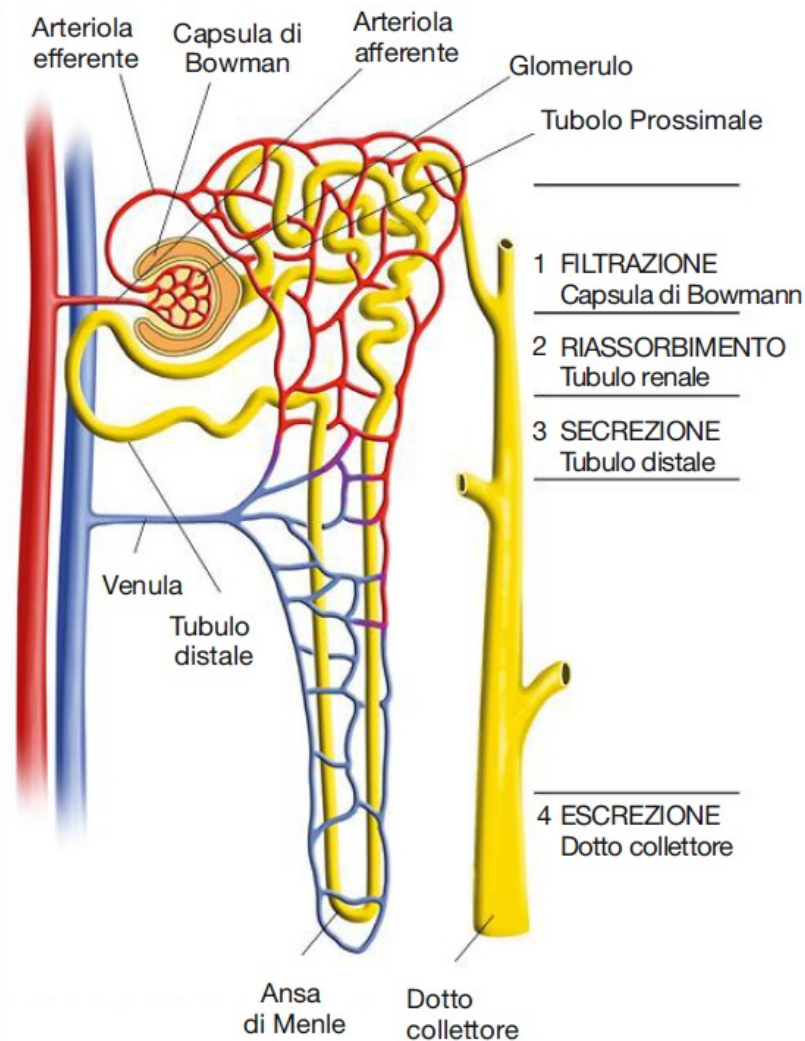
4. Le reazioni di biotrasformazione, che avvengono nell'apparato digerente, nel rene e a livello epatico, convertono il farmaco in metaboliti inattivi dotati di un più alto carattere di polarità, quindi più idrosolubili, in modo tale da essere più facilmente eliminati dall'organismo.



Farmacocinetica: dall'assorbimento all'eliminazione /6

5. L'eliminazione dei farmaci avviene per via renale, con la bile attraverso le feci o con altre vie (sudore, latte materno, saliva).

L'**escrezione renale** è la via di eliminazione fondamentale per i farmaci idrosolubili e si realizza con i meccanismi fisiologici caratteristici delle diverse parti del **nefrone**: filtrazione glomerulare, secrezione a livello del tubulo prossimale e riassorbimento nel tubulo distale.



Struttura di un nefrone.

Farmacocinetica: dall'assorbimento all'eliminazione /7

La **clearance** di una sostanza è il rapporto fra la sua concentrazione nel sangue e quella nelle urine, cioè è la capacità dell'organismo di allontanare dal sangue un dato composto.

La **clearance di un farmaco** è la quantità di plasma da cui il farmaco è allontanato nell'unità di tempo (mL/min).

Il **tempo di emivita** è il tempo necessario affinché la concentrazione massima di un farmaco nel sangue diminuisca del 50% dopo la sua completa distribuzione nell'organismo.

Si misura in ore o minuti e si indica con $t_{1/2}$.

L'**accumulo di un farmaco** si verifica quando è somministrato a intervalli di tempo regolari, per cui la sua concentrazione nel sangue e nei tessuti aumenta progressivamente.

Che cos'è la farmacodinamica /1

La **farmacodinamica** studia gli effetti specifici dei farmaci e il loro meccanismo d'azione nei confronti di organi o apparati, nonché la relazione fra la concentrazione dei farmaci e il loro effetto.

L'**azione di un farmaco** è la risultante dell'interazione fra principio attivo e macromolecole localizzate sulla superficie delle cellule o al loro interno, cioè i **recettori** (proteine).

Una sostanza è detta:

- **agonista** recettoriale quando interagisce con il recettore attivandolo ed evocando la sua tipica risposta biochimica
- **antagonista** recettoriale quando blocca il sito recettore, impedendo l'interazione con il ligando endogeno senza avere alcuna attività intrinseca

Che cos'è la farmacodinamica /2

La **dose** è la quantità di un farmaco necessaria per avere, dopo la sua somministrazione, uno specifico effetto farmacologico. Viene espressa in mg/kg di massa corporea.

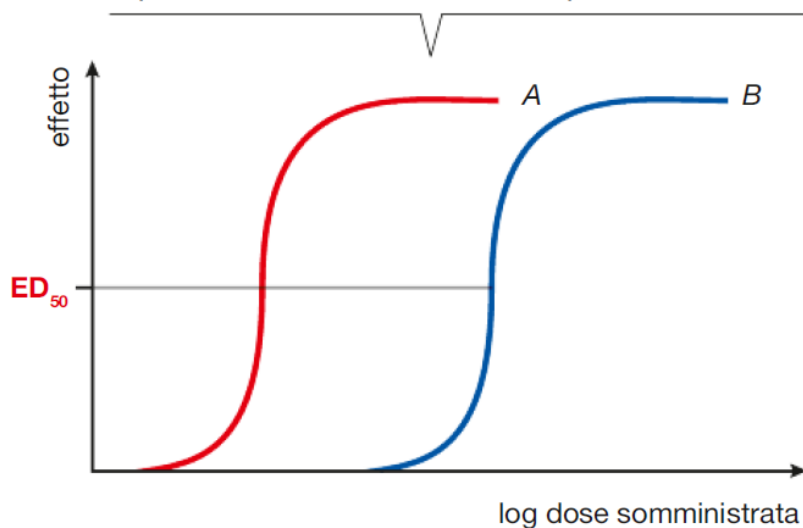
La relazione fra dose di un farmaco e risposta è espressa dalla **curva dose-risposta**, ottenuta ponendo in ascissa i valori delle dosi somministrate (in scala Log_{10}) e in ordinata la misura delle risposte ottenute (effetti misurati).

La **relazione dose-risposta** può essere di tipo:

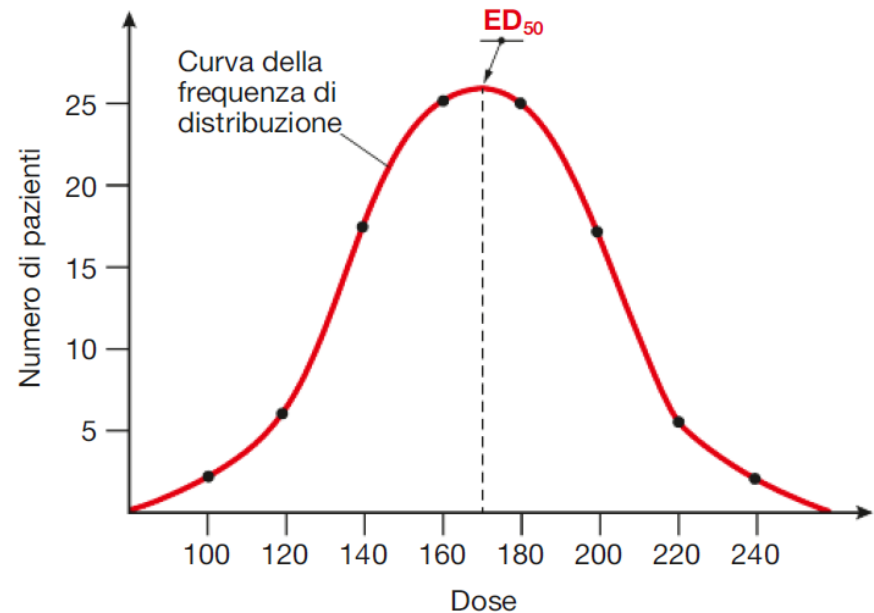
- **graduale**: permette di identificare la dose terapeutica e di paragonare l'efficacia di farmaci che hanno lo stesso effetto farmacologico
- **quantale**: misura la percentuale di individui che rispondono al farmaco all'interno di una popolazione

Che cos'è la farmacodinamica /3

Per ottenere la stessa ED_{50} , il farmaco A richiede una dose minore di quella del farmaco B; di conseguenza, si può affermare che il farmaco A è più efficace di B.



Relazione dose-risposta graduale.

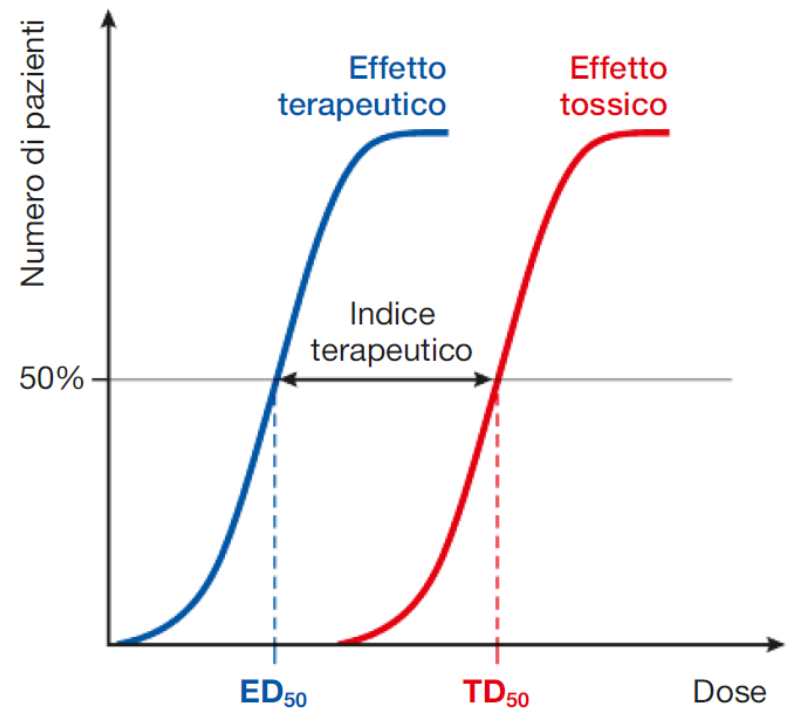


Relazione dose-risposta quantale (tutto o niente).

Che cos'è la farmacodinamica /4

Un farmaco è considerato sicuro se la **curva dose-effetto tossico** si colloca sulla destra e a debita distanza dalla **curva dose-effetto desiderato**.

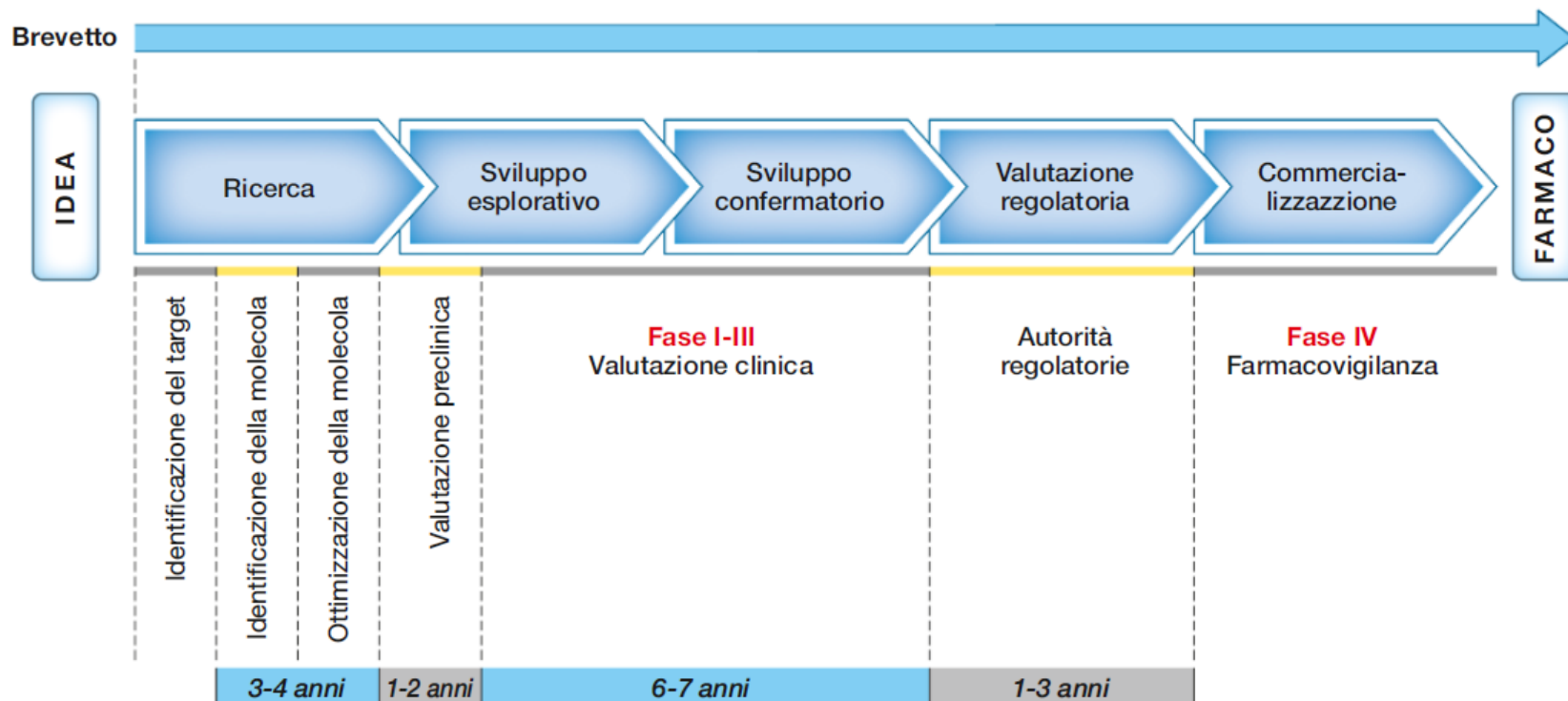
Le due curve permettono di stabilire l'**indice terapeutico**, dato dal rapporto fra TD_{50} ed ED_{50} , cioè fra la dose di un farmaco che risulta tossica per il 50% dei pazienti trattati e la dose dello stesso farmaco che risulta efficace nel 50% dei pazienti trattati.



Indice terapeutico.

Come nasce un nuovo farmaco /1

Il processo di ricerca e sviluppo:

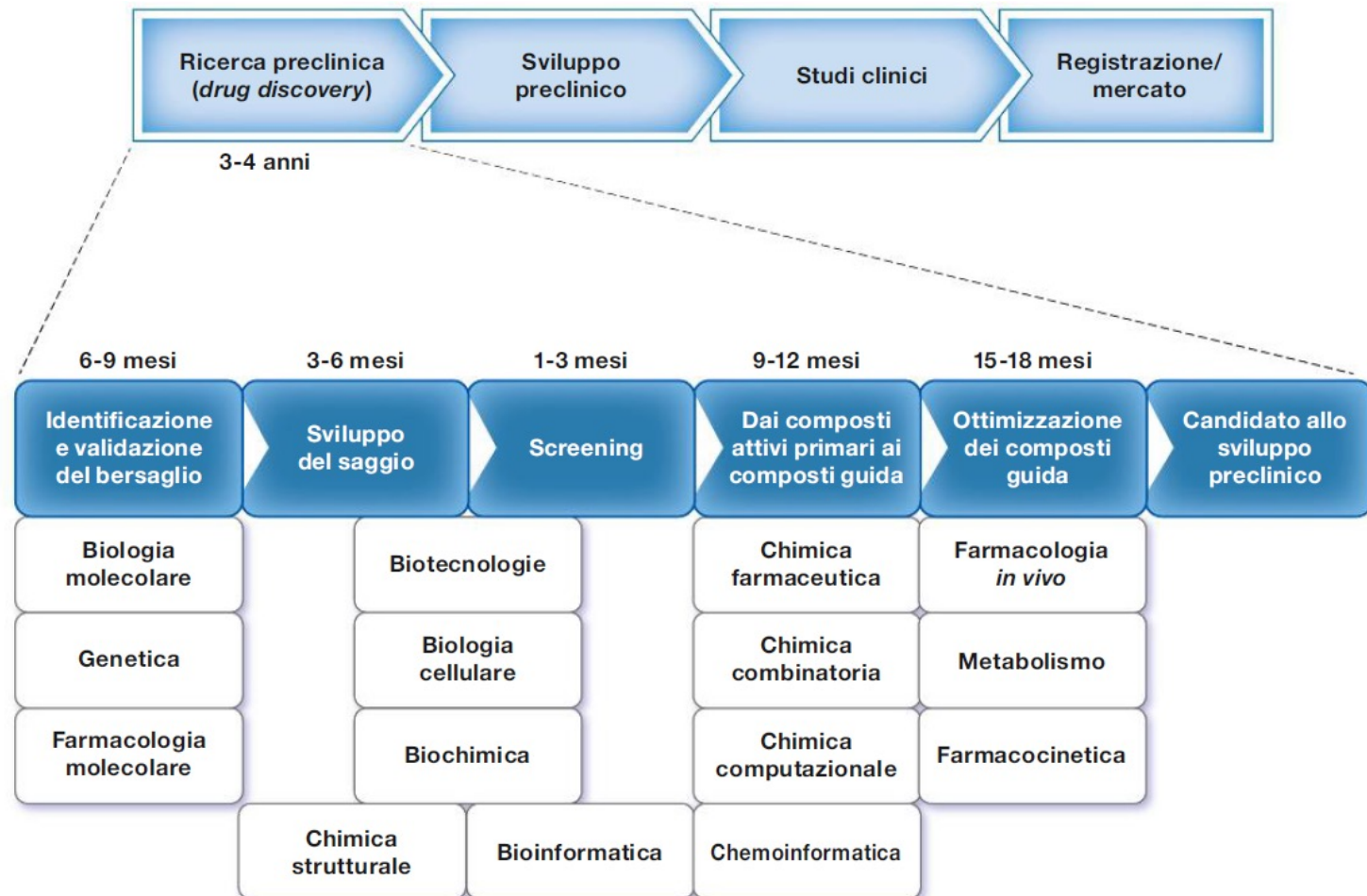


8000-10 000 nuove entità chimiche individuate ► solo pochissime avanzano nello sviluppo ► 1 entra in commercio

Dall'idea di un nuovo farmaco all'ingresso sul mercato sono necessari circa 10-15 anni. Costo totale $\geq 1\,000\,000\,000$ di euro

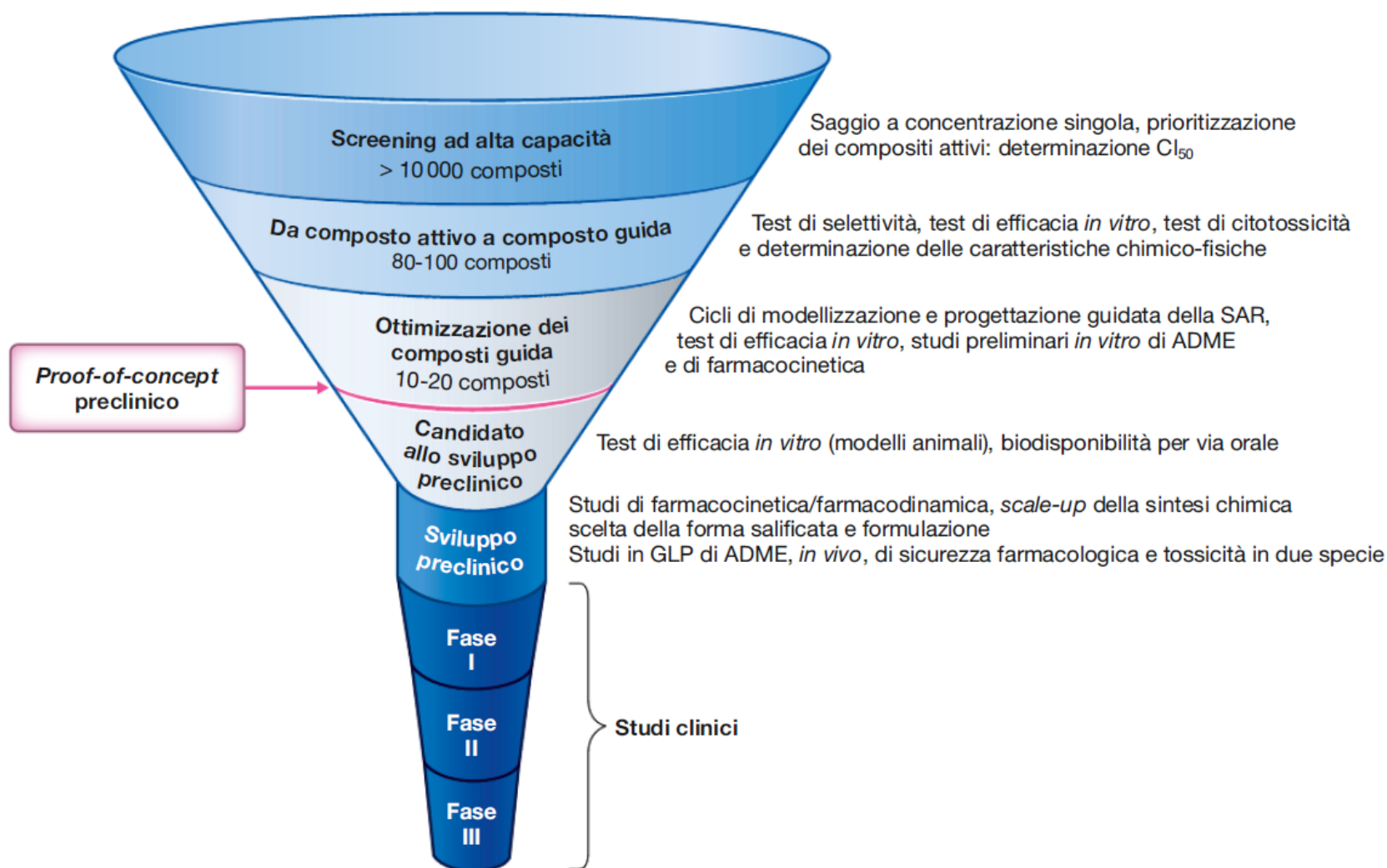
Come nasce un nuovo farmaco /2

Il processo di *drug discovery*:



Come nasce un nuovo farmaco /3

Selezione di un composto candidato allo sviluppo preclinico:



Come nasce un nuovo farmaco /4

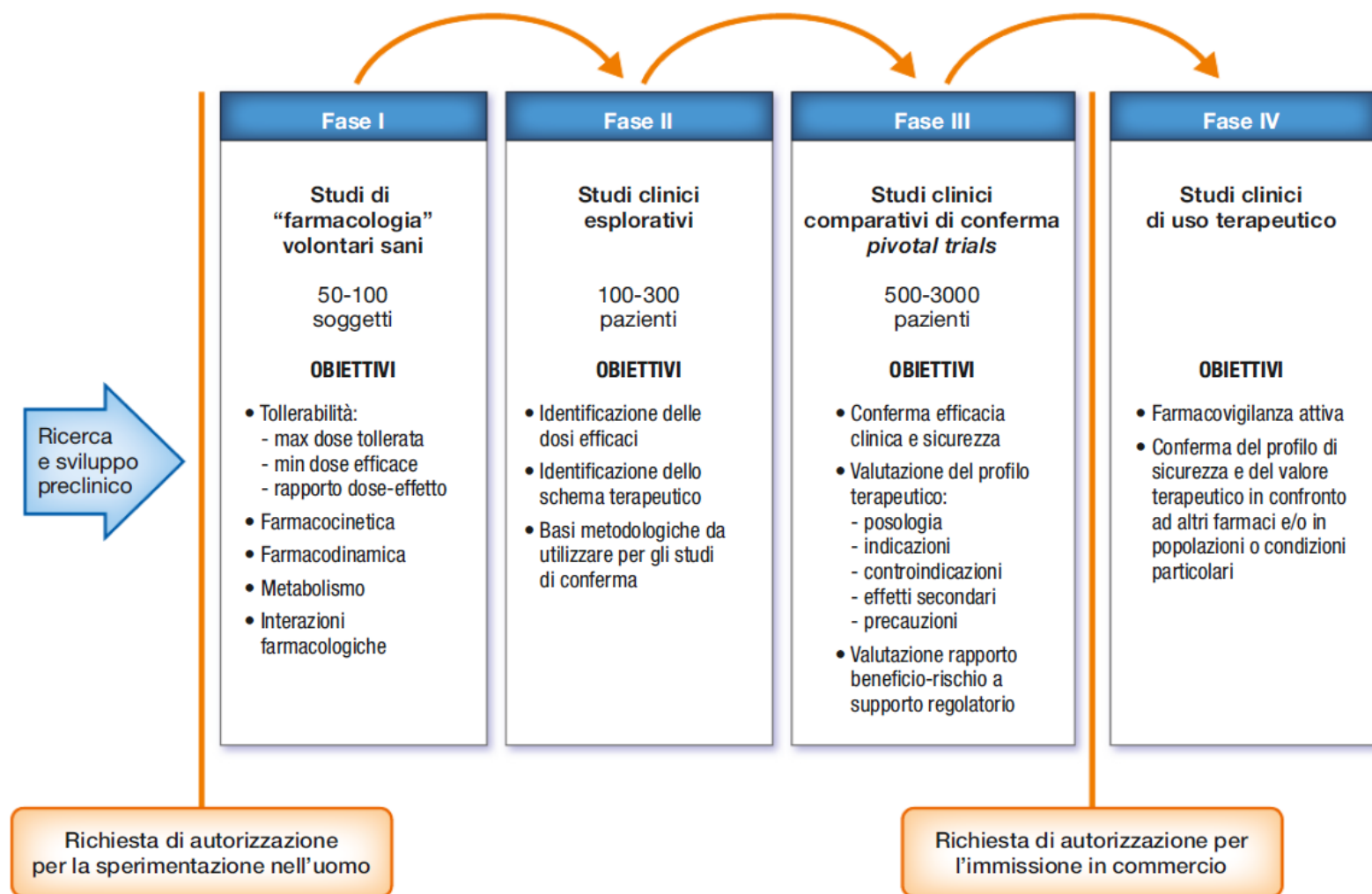
Nella fase di **sviluppo preclinico** le nuove molecole ottenute sono saggiate *in vitro* e *in vivo*. Obiettivi:

- approfondire le proprietà chimico-fisiche delle molecole
- stabilire lo spettro di attività del farmaco, l'efficacia e la sua eventuale tossicità
- determinare le concentrazioni farmacologicamente efficaci rispetto a quelle tossiche

In seguito, il possibile farmaco è avviato alla **sperimentazione clinica** (*clinical trial*). Obiettivo:

- investigare nell'organismo umano sia gli aspetti legati all'**azione farmacodinamica** (efficacia terapeutica, effetti collaterali o tossici, meccanismo d'azione), sia quelli legati all'**azione farmacocinetica**, cioè assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione della molecola.

Le tre fasi della sperimentazione clinica



Farmacovigilanza: monitoraggio di rischi e benefici

La fase IV della sperimentazione consiste nella **farmacovigilanza**: ha lo scopo di monitorare rischi e benefici dei farmaci, una volta che essi sono entrati in commercio.

Le **reazioni avverse** o **ADR** (*adverse drug reaction*) e gli effetti collaterali sono catalogati come:

- rari, distinguibili in specifici e aspecifici
- successivi a trattamenti prolungati
- a lunga latenza
- da interazione con altri farmaci
- relativi a specifici gruppi a rischio