

# Caratteristiche di un farmaco tradizionale

- Generalmente è una molecola di piccole dimensioni e relativamente semplice
- L'azione farmacologica è in funzione della struttura chimica e può essere modificata dalle modalità di somministrazione e dalla sua formulazione
- Lo sviluppo richiede in genere l'identificazione di una nuova un'entità chimica
- Il farmaco non è ottenuto da materiale vivente, ma da molecole o reagenti chimici standard, tramite reazioni di chimica organica e riproducibili grazie alle metodiche analitiche attualmente disponibili
- Per l'autorizzazione all'immissione in commercio si valutano gli studi relativi alla posologia, all'efficacia clinica e alla sicurezza

# Farmaco biologico/biotecnologico

Farmaco il cui principio attivo è rappresentato da una sostanza (generalmente una proteina ad alto peso molecolare) prodotta **naturalmente** da un organismo vivente (microrganismi o cellule animali) (farmaco biologico propriamente detto) oppure farmaco derivante da una sorgente biologica attraverso l'utilizzo delle **tecniche del DNA ricombinante** (farmaci biotecnologici).



**Farmaco biologico**  
Emoderivati,  
immunoglobuline, vaccini  
tradizionali



**Farmaco biotecnologico**  
Anticorpi monoclonali,  
vaccini ricombinanti

## Farmaco biologico definizione dell'European Medicines Agency (EMA)

Proteina o sostanza farmaceutica a base di acidi nucleici usata per scopi terapeutici o diagnostici, che è prodotta attraverso metodiche diverse dall'estrazione diretta da una fonte nativa (non ingegnerizzata).

In base a questa definizione i farmaci biologici risultano ristretti a preparazioni prodotte con la tecnologia del DNA ricombinante.

# Caratteristiche dei farmaci biologici/biotecnologici

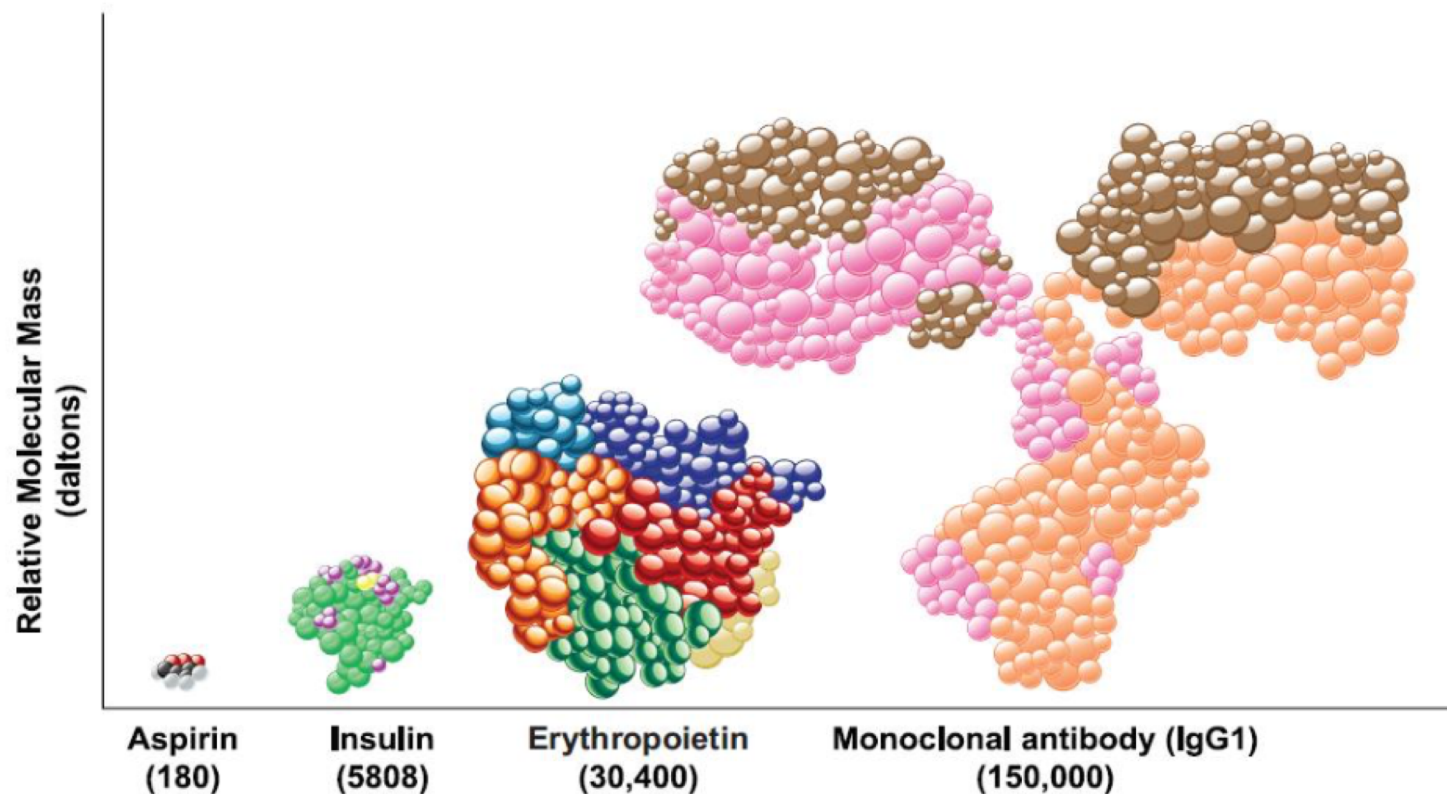
- Molecole di dimensioni molto grandi e complesse
- L'azione farmacologica è funzione della composizione molecolare, della sua forma e struttura tridimensionale
- Lo sviluppo richiede l'identificazione di una nuova proteina o altra entità chimica
- Le tecniche di produzione sono complesse e dipendono da:
  - Substrato biologico/organismo (cellula ospite utilizzata, plasmidi impiegati per trasfettare/infettare la cellula ospite)
  - Fattori ambientali
  - Materiale e condizioni di crescita/fermentazione
  - Possibile manipolazione genetica
  - Metodiche di estrazione e purificazione
- Per l'autorizzazione all'immissione in commercio si valutano gli studi relativi alla posologia, all'efficacia clinica e alla sicurezza



# Farmaci di sintesi vs farmaci biologici

Farmaci di sintesi	Farmaci biologici
Prodotti attraverso sintesi chimica	Prodotti da colture cellulari
<b>Basso peso molecolare</b>	<b>Alto peso molecolare</b>
Struttura ben definita	Struttura complessa e eterogenea e talvolta non ben definita
Attività indipendente dal processo di produzione	Attività fortemente dipendente dal processo di produzione
Caratterizzato nella sua totalità	Impossibile caratterizzare completamente la composizione molecolare
Stabile	Non stabile
Non immunogenico	Immunogenico
Effetti multipli	Effetto specifico

# Complessità dei farmaci biologici



# Farmaci di sintesi vs farmaci biologici

Farmaci di sintesi	Farmaci biologici
Prodotti attraverso sintesi chimica	Prodotti da colture cellulari
Basso peso molecolare	Alto peso molecolare
<b>Struttura ben definita</b>	<b>Struttura complessa e eterogenea e talvolta non ben definita</b>
Attività indipendente dal processo di produzione	Attività fortemente dipendente dal processo di produzione
Caratterizzato nella sua totalità	Impossibile caratterizzare completamente la composizione molecolare
Stabile	Non stabile
Non immunogenico	Immunogenico
Effetti multipli	Effetto specifico

# Eterogeneità dei farmaci biologici

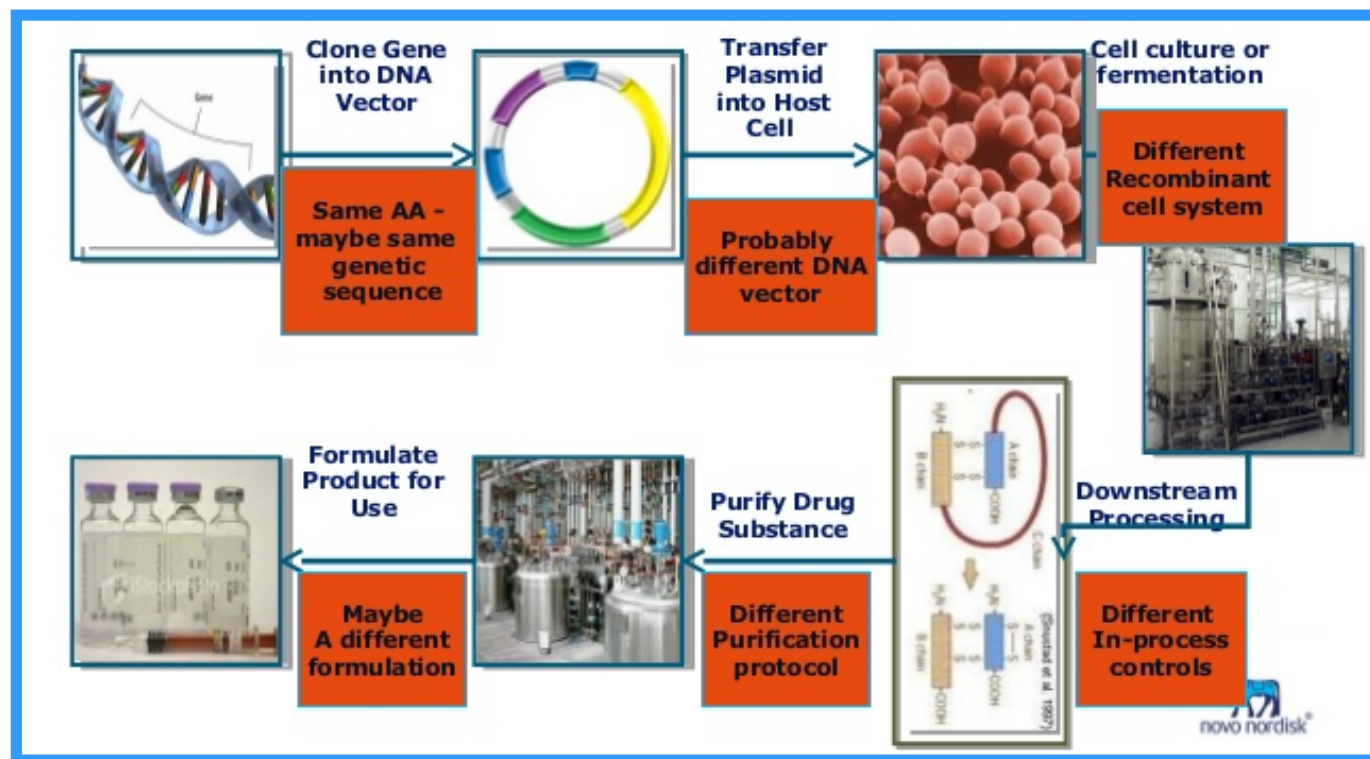
- Poiché sono prodotti da diversi tipi cellulari, possono presentare un gran numero di modificazioni:
  - *Glicosilazioni*: carboidrati si combinano con le proteine a formare glicoproteine
  - *Proteolisi*: degradazione diretta o digestione delle proteine
  - *Acilazione*: un atomo di idrogeno in un composto organico è sostituito da un gruppo acilico
  - *Solfatazione*: trasferimento di un sulfonato ad una proteina

# Farmaci di sintesi vs farmaci biologici

Farmaci di sintesi	Farmaci biologici
Prodotti attraverso sintesi chimica	Prodotti da colture cellulari
Basso peso molecolare	Alto peso molecolare
Struttura ben definita	Struttura complessa e eterogenea e talvolta non ben definita
<b>Attività indipendente di processo di produzione</b>	<b>Attività fortemente dipendente dal processo di produzione</b>
Caratterizzato nella sua totalità	Impossibile caratterizzare completamente la composizione molecolare
Stabile	Non stabile
Non immunogenico	Immunogenico
Effetti multipli	Effetto specifico

# Il processo è il prodotto

A differenza dei farmaci tradizionali ottenuti per sintesi chimica, la struttura molecolare dei farmaci biologici è strettamente dipendente dal processo di produzione che può durare mesi e che comprende tappe complesse.



# Farmaci di sintesi vs farmaci biologici

Farmaci di sintesi	Farmaci biologici
Prodotti attraverso sintesi chimica	Prodotti da colture cellulari
Basso peso molecolare	Alto peso molecolare
Struttura ben definita	Struttura complessa e eterogenea e talvolta non ben definita
Attività indipendente dal processo di produzione	Attività fortemente dipendente dal processo di produzione
Caratterizzato nella sua totalità	Impossibile caratterizzare completamente la composizione molecolare
Stabile	Non stabile
Non immunogenico	Immunogenico
Effetti multipli	Effetto specifico

# Farmaci biologici/biotecnologici disponibili in commercio

- Anticorpi monoclonali (adalimumab, rituximab, ranibizumab, trastuzumab, panitumumab, certolizumab, golimumab, infliximab, canakinumab, tocilizumab, cetuximab, bevacizumab, omalizumab, natalizumab, palivizumab, ustekinumab, brentuximab vedotin, pertuzumab, eculizumab)
- Inibitori delle tirosin-chinasi (sorafenib, sunitinib, imatinib, regorafenib, erlotinib)
- Citochine e loro antagonisti recettoriali (interferone-alfa, aldesleukin)
- Proteine di fusione (etanercept, aflibercept, abatacept)
- Ormoni (insulina, eritropoietina, somatotropina)
- Fattori di crescita (G-CSF)
- Fattori della coagulazione
- Vaccini (tradizionali e ricombinanti) (vaccino anti-epatite B, anti-HPV)



# Proteine terapeutiche

Biofarmaci naturali	Proteine di origine estrattiva prodotte per uso clinico
Farmaci biotecnologici Prima generazione	Proteine native prodotte con la tecnica del DNA ricombinante
Seconda generazione	Proteine naturali modificate (mutazione di un singolo o pochi a.a., iper glicosilazione, peghilazione...) che mantengono la stessa attività biologica ma hanno un migliorato profilo di efficacia/tollerabilità o un profilo farmacocinetico più idoneo.
Terza generazione	Proteine altamente modificate (mutazioni di molti anticorpi, chimere) per ottenere molecole con attività anche differenti dalla proteina naturale.

# Problemi dei biofarmaci naturali

- prodotti naturalmente da un organismo vivente
  - Difficoltà di estrazione
  - La somministrazione di ormoni da animali (insulina) poteva causare l'attivazione di una risposta immune
  - Pericolo di trasmissione di agenti infettivi tra specie o individui (malattia di Creutzfeldt-Jakob in pazienti trattati con ormone della crescita umano)

# Proteine terapeutiche

Biofarmaci naturali	Proteine di origine estrattiva prodotte per uso clinico
Farmaci biotecnologici Prima generazione	Proteine native prodotte con la tecnica del DNA ricombinante
Seconda generazione	Proteine naturali modificate (mutazione di un singolo o pochi a.a., oppure iper glicosilazione, pegilazione...) che mantengono la stessa attività biologica ma hanno un migliorato profilo di efficacia/tollerabilità o un profilo farmacocinetico più idoneo.
Terza generazione	Proteine altamente modificate (mutazioni di molti aa, chimere) per ottenere molecole con attività anche differenti dalla proteina naturale (ancora in fase di ricerca)

- I farmaci biotecnologici di prima generazione sono semplici copie di proteine umane prodotte attraverso la trasfezione del gene umano in un appropriato sistema di espressione ma....
- Problemi intrinseci delle proteine
  - Scarsa stabilità
  - Tendenza all'aggregazione
- Problemi farmacocinetici
  - Breve  $t_{1/2}$
  - Scarso o nullo assorbimento
- Problemi farmacodinamici
  - Bassa affinità
  - Scarsa selettività
- Immunogenicità

# Proteine terapeutiche

Biofarmaci naturali	Proteine di origine estrattiva prodotte per uso clinico
Farmaci biotecnologici Prima generazione	Proteine native prodotte con la tecnica del DNA ricombinante
Seconda generazione	Proteine naturali modificate (mutazione di un singolo o pochi a.a., oppure iper glicosilazione, pegilazione...) che mantengono la stessa attività biologica ma hanno un migliorato profilo di efficacia/tollerabilità o un profilo farmacocinetico più idoneo.
Terza generazione	Proteine altamente modificate (mutazioni di molti aa, chimere) per ottenere molecole con attività anche differenti dalla proteina naturale (ancora in fase di ricerca)

# Strategie per migliorare le caratteristiche delle proteine naturali

1. Manipolazione della struttura primaria
  - Mutazioni/delezioni a livello dei "loops" per ridurre la flessibilità, con conseguente diminuzione della suscettibilità alla proteolisi
  - Mutazione sito specifica per inserire siti addizionali di glicosilazione (eritropoietina)
  - Mutazione di epitopi immunogenici (eritropoietina)
  - Mutazione sito specifica cisteina/serina (IFN $\beta$ 1b, G-CSF)

# L'importanza della glicosilazione

**Table IV.** Functions of Glycoprotein Glycans

Type	Function
Physicochemical	Modify solubility, electrical charge, mass, size, and viscosity in solution Control protein folding Stabilize protein conformation Confer thermal stability and protection against proteolysis
Biological	Regulate intracellular trafficking and localization Determine circulation half-life Modify immunological properties Modulate activity Act as cell surface receptors for lectins, antibodies, toxins, and so forth Participate in cell-cell interactions

Aranesp®  
(darbepoetin alfa)

Epo

Amgen

Anemia

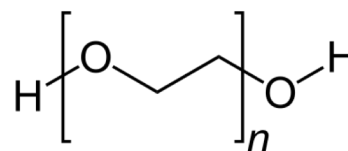
Additional  
glycosylation sites

Increased serum half-life;  
weaker receptor binding

# Strategie per migliorare le caratteristiche delle proteine naturali

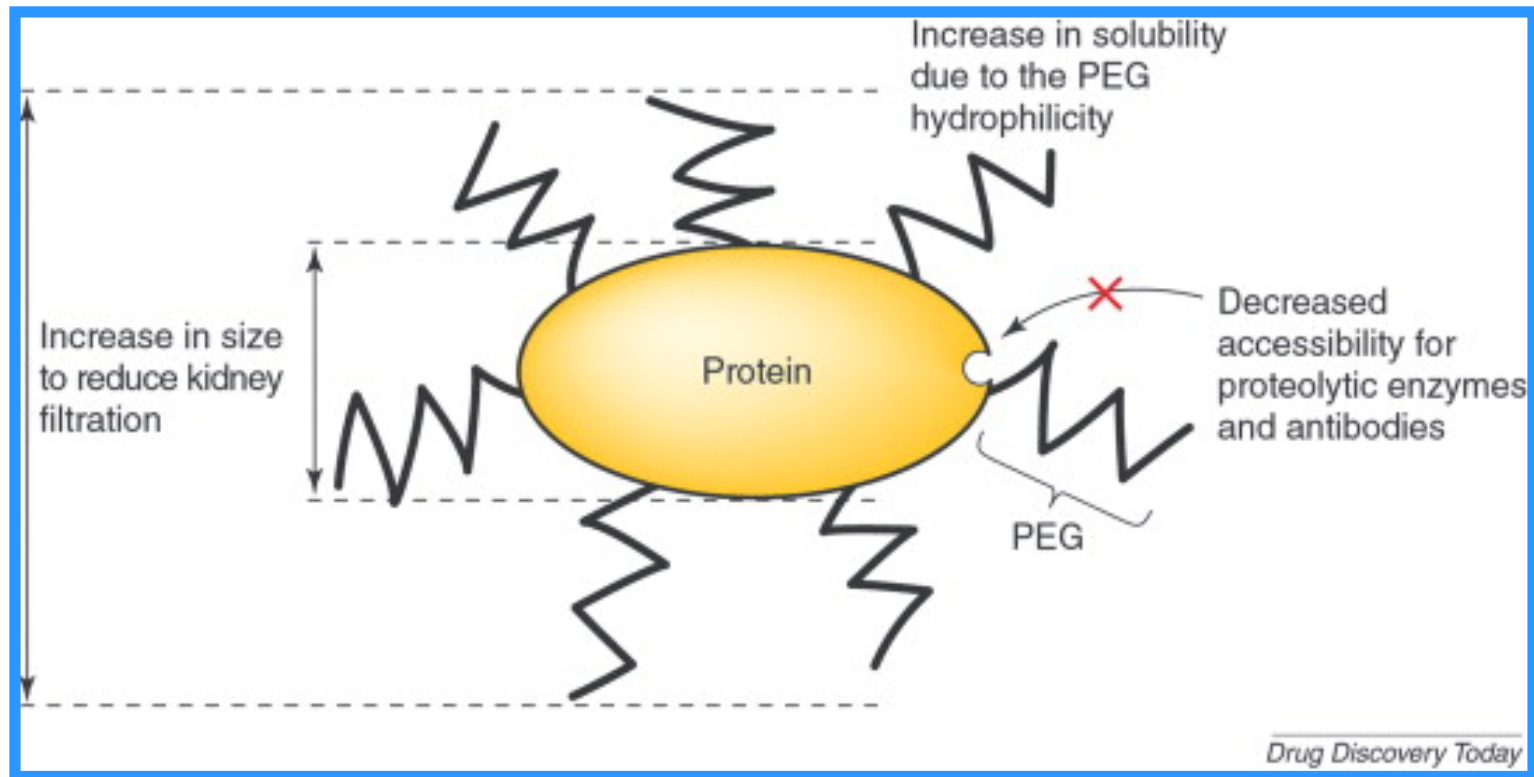
## 2. Modificazioni chimiche post traslazionali

- Peghilazione: la proteina viene legata al polietilene glicole, polimero altamente flessibile che aumenta significativamente la dimensione della proteina, migliorandone la farmacocinetica, riducendo l'immunogenicità e l'aggregazione



Polietilene glicole





**Table 1. Currently Marketed Pegylated Agents**

PEG Conjugate	Generic Name (Trade Name)/ Manufacturer (FDA Approval Date)	Bioactivity of Native Agent	Main Effect of Pegylation	Reason for Treatment
ADA	Pegademase (Adagen)/ Enzon (March 1990)	Enzyme replacement, reverses symptoms of ADA deficiency	Longer half-life, reduced immune response <sup>11</sup>	SCID as a result of ADA deficiency
Asparaginase	Pegaspargase (Oncaspar)/ Enzon (February 1994)	Hydrolyzes asparagine, on which leukemic cells are dependent	Longer half-life, reduced immune response <sup>5</sup>	In combination chemotherapy, for treatment of acute lymphoblastic leukemia in patients hypersensitive to L-asparaginase
Granulocyte colony-stimulating factor	Pegfilgrastim (Neulasta)/ Amgen (January 2002)	Stimulation of neutrophil production	Longer half-life, self-regulating clearance <sup>12</sup>	Prophylaxis against severe neutropenia and its complications during myelosuppressive chemotherapy
Interferon $\alpha$ 2b	Peginterferon $\alpha$ 2b (PEG-Intron)/Schering (January 2001)	Antiviral cytokine	Slower clearance, sustained serum concentration <sup>13</sup>	Hepatitis C in patients with normal liver function
Interferon $\alpha$ 2a	Peginterferon $\alpha$ 2a (Pegasys)/Roche (October 2002)	Antiviral cytokine	Slower clearance, sustained serum concentration <sup>2</sup>	Hepatitis C in patients with compensated liver disease
Stealth PEG liposomes for delivery of doxorubicin	Pegylated liposomal doxorubicin (Caelyx, Doxil)/Alza (June 1999)	Antitumor anthracycline	Slower clearance, greater distribution into tumors <sup>7, 14</sup>	Kaposi's sarcoma, refractory ovarian cancer

PEG = polyethylene glycol; FDA = Food and Drug Administration; ADA = adenosine deaminase; SCID = severe combined immunodeficiency disease.

- Altre modifiche intenzionali nel disegno di farmaci biotecnologici come:
  - Coniugazione: modificazione covalente di una proteina con una molecola più piccola (ed es. coniugazione di un anticorpo monoclonale con una molecola citotossica)
  - Radiomarcatura: incorporazione di un isotopo radioattivo nella molecola.

Ontak®  
(denileukin diftotox)

Diphtheria  
toxin-IL-2

Seragen/Ligand

Cancer

Fusion

Targets cancer cells

# Strategie per migliorare le caratteristiche delle proteine naturali

## 2. Modificazioni chimiche post traslazionali

- Insulina detemir (acilazione LysB29, Novo Nordisk)
- INF $\alpha$ , peptide GLP1, desmopressina (legame di acidi grassi a residui attivi sulla superficie della proteina)
- Migliorano il legame con le proteine plasmatiche e quindi prolungano l'emivita

# Strategie per migliorare le caratteristiche delle proteine naturali

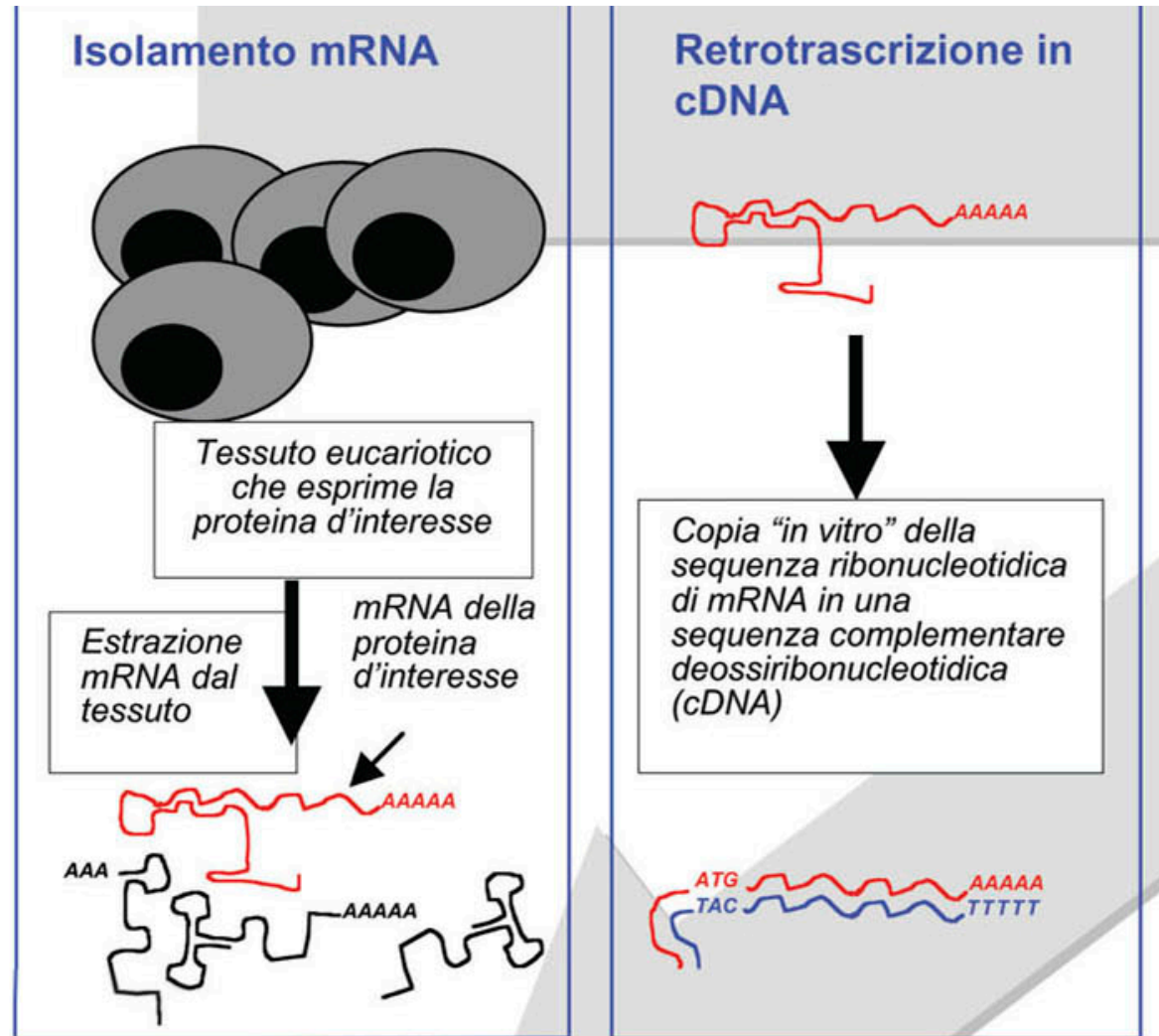
## 3. Utilizzo di partners di fusione

- Fusione omologa (etanercept)
- Fusione eterologa (regione FC degli anticorpi IgG) aumenta significativamente l'emivita delle proteine; generalmente non ne modifica struttura e funzione; tende a dimerizzare, aumentando in molti casi l'affinità della proteina per il suo recettore

# Proteine terapeutiche

Biofarmaci naturali	Proteine di origine estrattiva prodotte per uso clinico
Farmaci biotecnologici Prima generazione	Proteine native prodotte con la tecnica del DNA ricombinante
Seconda generazione	Proteine naturali modificate (mutazione di un singolo o pochi a.a., oppure iper glicosilazione, pegilazione...) che mantengono la stessa attività biologica ma hanno un migliorato profilo di efficacia/tollerabilità o un profilo farmacocinetico più idoneo.
Terza generazione	Macromolecole (compresi acidi nucleici e proteine altamente modificate, mutazioni di molti aa, chimere) con attività anche differenti dalla proteina naturale (ancora in fase di ricerca)

# Preparazione di proteine ricombinanti



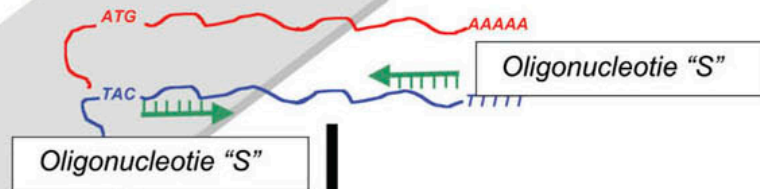


# Preparazione di proteine ricombinanti

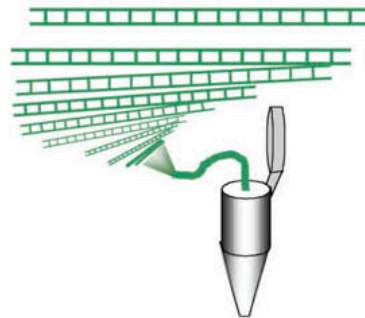
## Isolamento, amplificazione e conversione del cDNA in doppio filamento di DNA

Amplificazione tramite PCR del cDNA d'interesse:

- selezione di un oligonucleotide a singola elica complementare alla sequenza a valle dell'ATG di inizio (S);
- selezione di un oligonucleotide antisenso (AOS) complementare alla sequenza a monte del codone di stop



Amplificazione della sequenza nucleotidica delimitata dai due oligonucleotidi.  
Purificazione del materiale amplificato  
( $> 10^{20}$  copie)



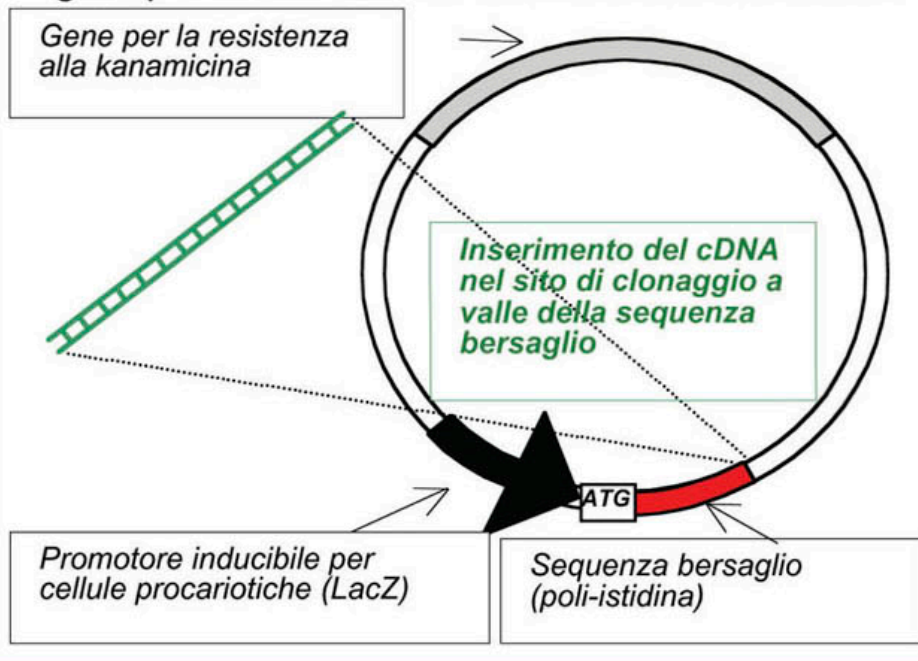


# Preparazione di proteine ricombinanti

## Inserimento del cDNA a doppia elica in un vettore di espressione per cellule procariotiche

Caratteristiche del vettore:

- sequenza bersaglio per l'isolamento della proteina clonata a valle del sito di clonaggio
- ATG di inizio trascrizione a valle della sequenza bersaglio
- promotore inducibile per la trascrizione in cellule procariotiche (*LacZ*)
- gene per la selezione del clone batterico trasformato

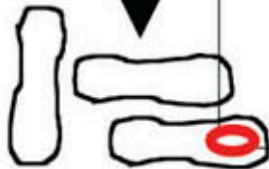


# Preparazione di proteine ricombinanti

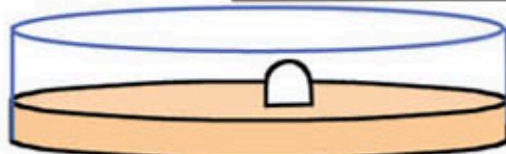
**Trasformazione di *E. coli* competenti, selezione e crescita del clone trasformato**



*Trasformazione per shock termico:  
0°C per 30',  
42°C per 15"*



Selezione in terreno semisolido (Agar) e antibiotico (kanamicina)



Colonia batterica

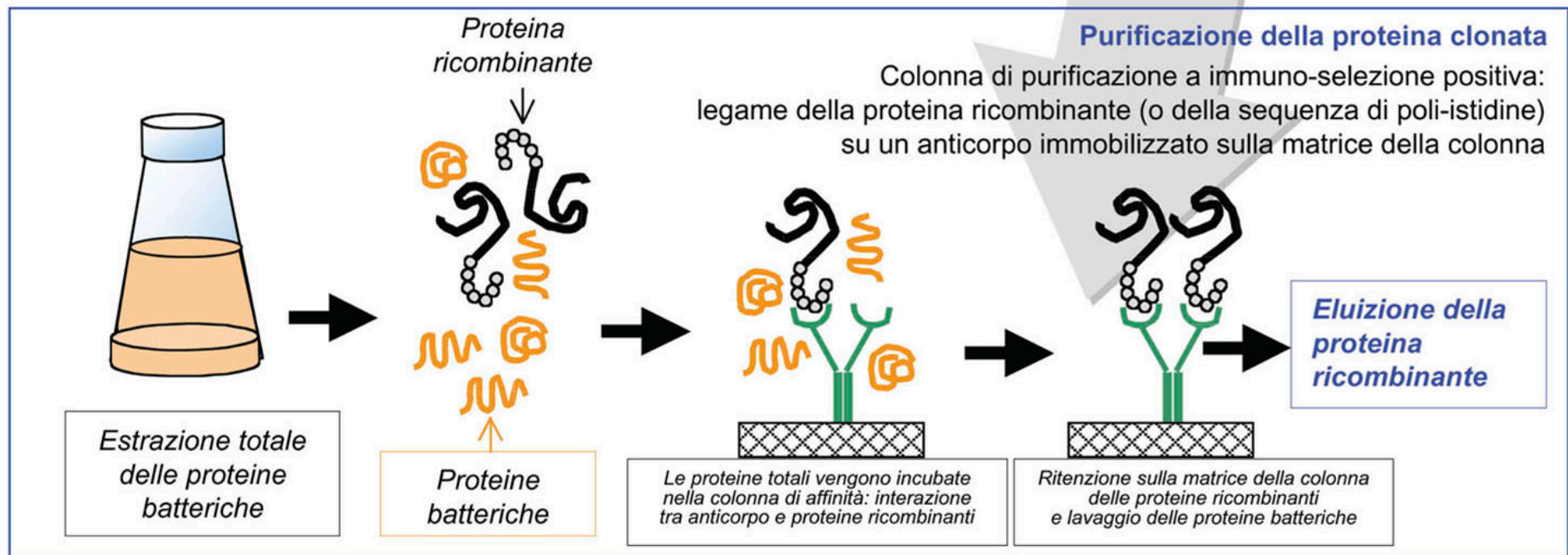
**Induzione della sintesi proteica ed estrazione delle proteine totali**

*Coltura della colonia batterica in terreno liquido di crescita (brodo) addizionato del farmaco di selezione e dell'induttore della trascrizione proteica (IPTG)*



*Crescita a 37°C  
in agitazione*

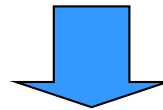
# Preparazione di proteine ricombinanti



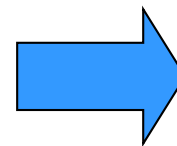
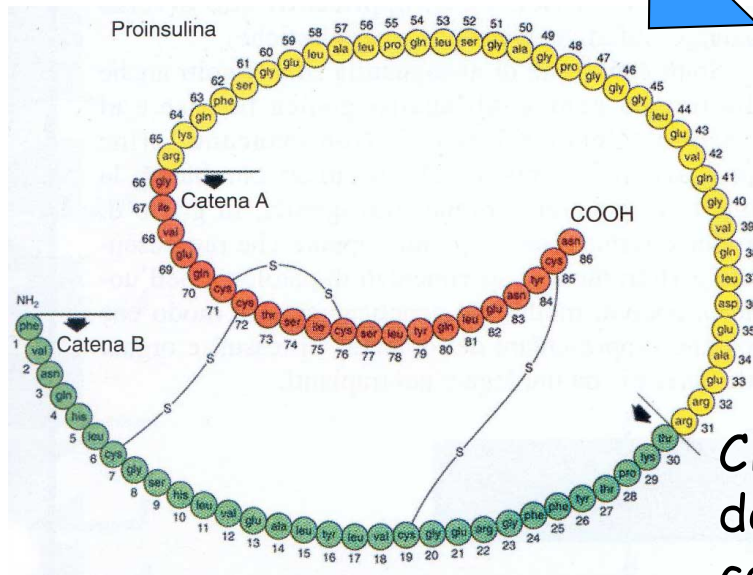
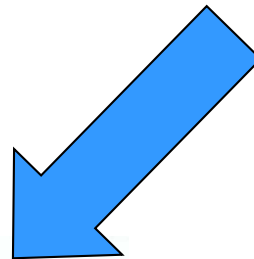
# Insulina ricombinante

- Adatta ad essere prodotta con le tecniche del DNA ricombinante
  - Non è modificata dopo la traduzione dall'aggiunta di zuccheri
  - È una proteina relativamente piccola (catena A: 21 aa, catena B: 30 aa)

# Preproinsulina

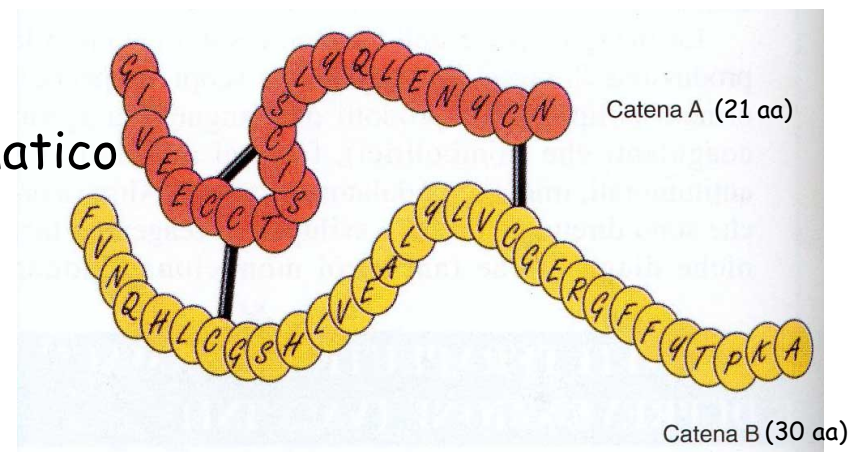


# Proinsulina



Clivaggio enzimatico del polipeptide centrale

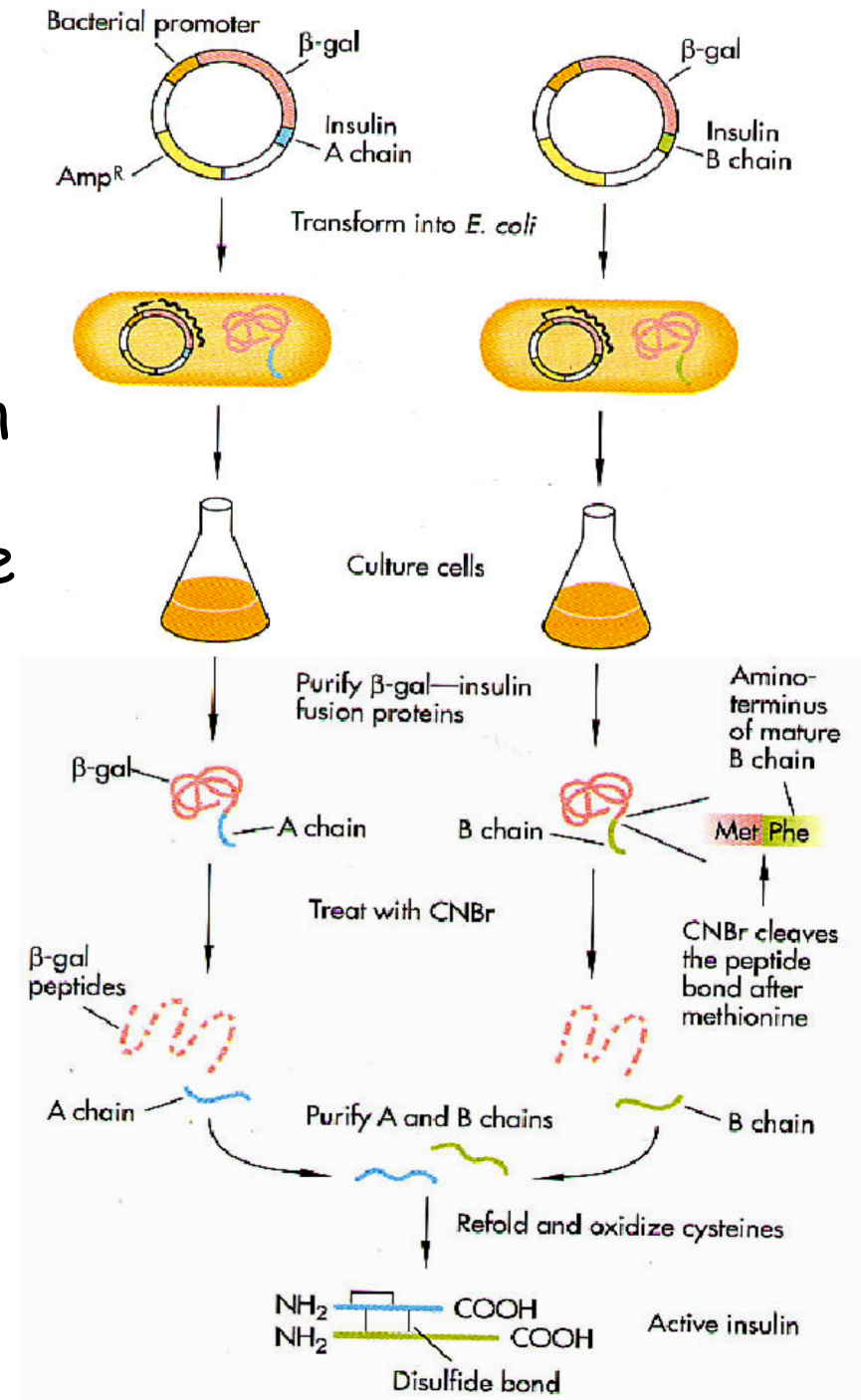
# Insulina



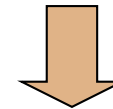
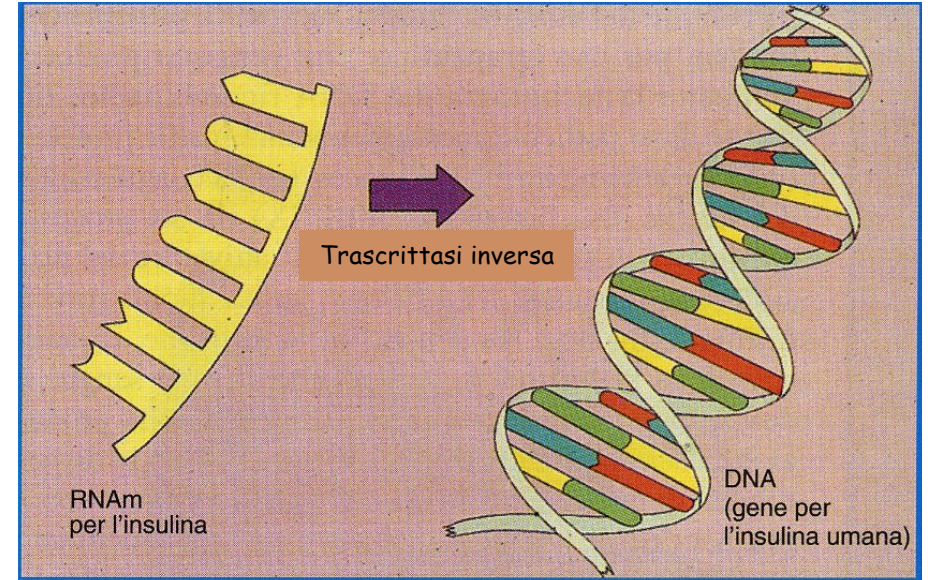
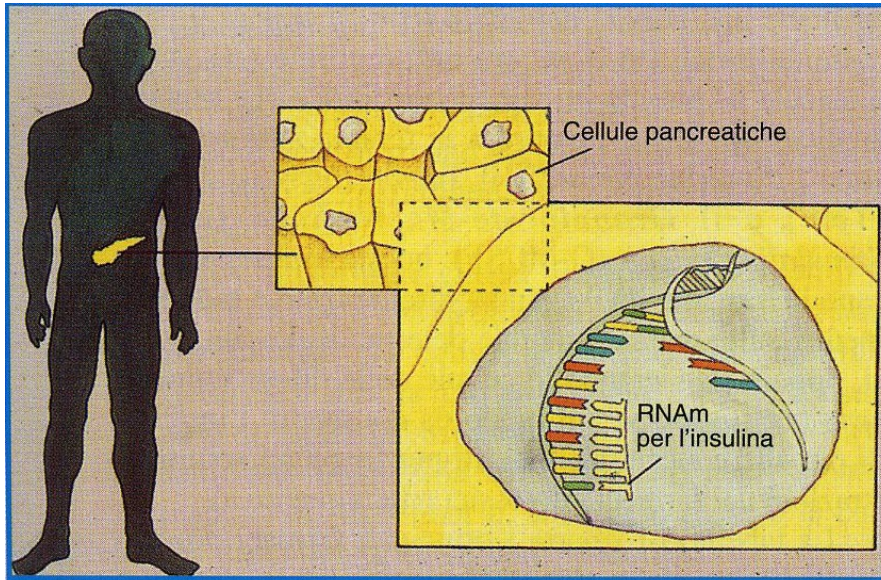


# Insulina umana (settembre 1982)

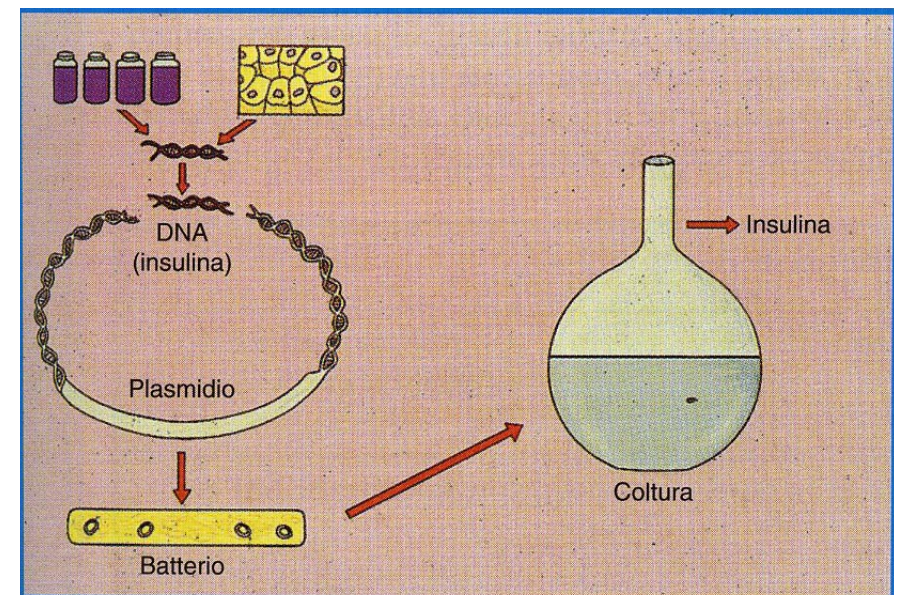
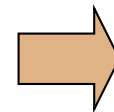
- Produzione di proinsulina, inserendo nei batteri il gene in toto e quindi convertendo la proinsulina in insulina mediante clivaggio chimico
- Produzione da parte di due colture batteriche (rispettivamente ingegnerizzate con i geni che codificano per le catene A e B) delle singole catene polipeptidiche e quindi legandole chimicamente tra loro mediante ponti disolfuro



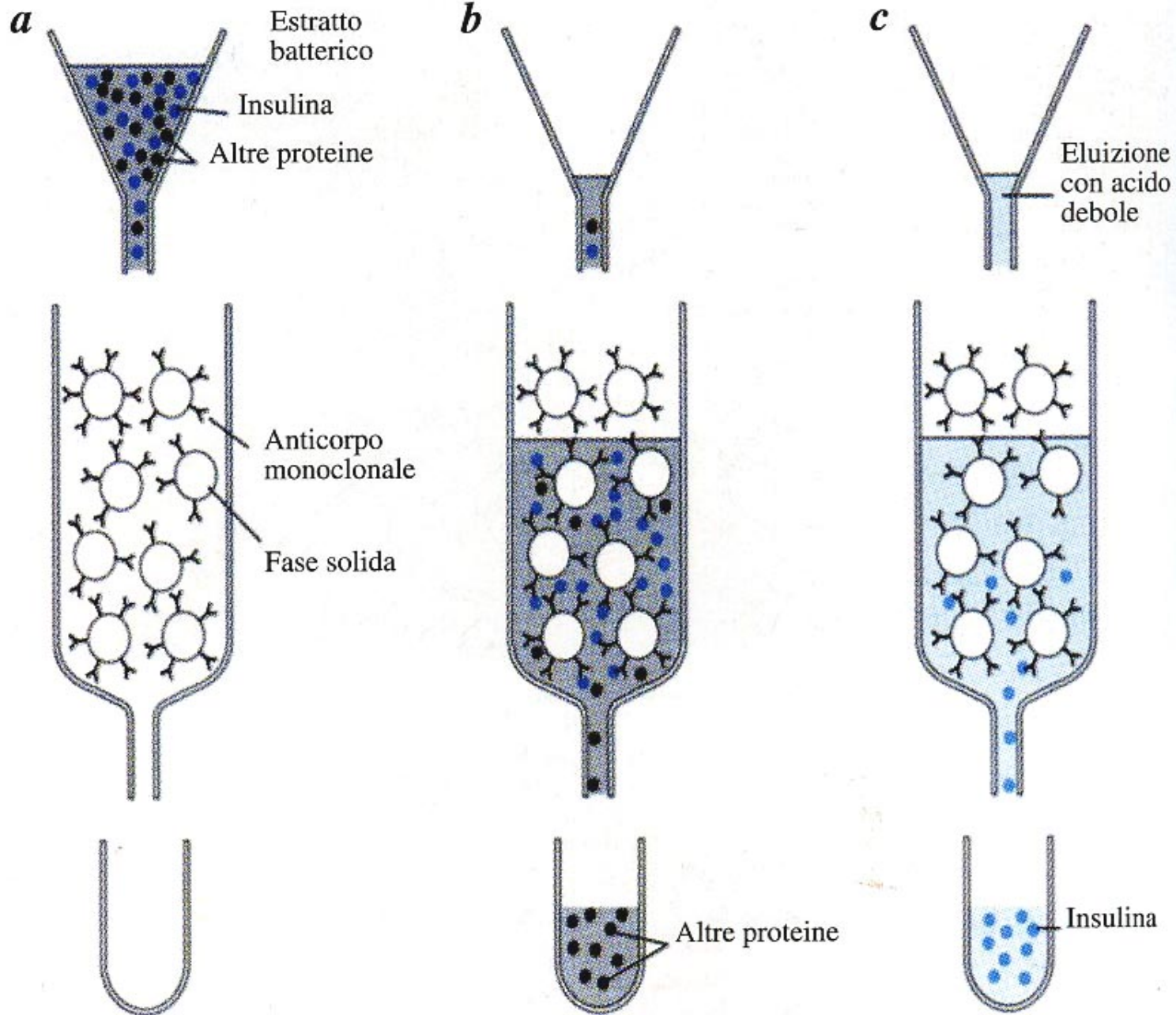




Oppure il gene può essere sintetizzato in laboratorio legando nel corretto ordine le basi nucleotidiche; la corretta sequenza è dedotta dalla sequenza degli aminoacidi nella molecola di proinsulina









# Sistemi che utilizzano cellule batteriche

- Vantaggi
  - Crescita rapida
  - Facili da gestire
- Svantaggi
  - Le cellule batteriche non compiono lo stesso tipo di processi posttraslazionali delle cellule dei mammiferi (ad esempio glicosilazione)
  - Il prodotto può contenere endotossine che devono essere rimosse

# In alternativa..

- Cellule di mammifero (ad esempio cellule CHO di ovaio di criceto cinese)
  - Crescita più lenta
  - Le colture sono più difficili da portare avanti
  - Aumento dei costi

	Procariote	Eucariote	
	<i>E. Coli</i>	Lievito	Cellule umane
Dimensioni e caratteristiche del DNA	4.6 Mbp, circolare	12.1 Mbp, cromosomico	2000-3000 Mbp, cromosomico
Modificazioni post-traduzionali	Nessuna	Diverse da quelle umane	Simili o identiche a quelle umane
Velocità di crescita (cicli per ora)	3.33/h	0.25/h	0.02/h
Metodo di coltivazione	Fermentazione	Fermentazione	Fermentazione (cellule in sospensione) Roller bottle (cellule in adesione)
Costo	Basso	Intermedio	Alto

# Insuline per uso umano

Insulina	Posizione aa						
	Catena A			Catena B			
	8	10	21	28	29	30	31 & 32
Insulina umana	Thr	Ile	Asn	Pro	Lys	Thr	-
Insulina bovina	<i>Ala</i>	<i>Val</i>	Asn	Pro	Lys	Thr	-
Insulina suina	Thr	Ile	Asn	Pro	Lys	<i>Ala</i>	-
Insulina Lispro	Thr	Ile	Asn	<i>Lys</i>	<i>Pro</i>	Thr	-
Insulina-asp	Thr	Ile	Asn	<i>Asp</i>	Lys	Thr	-
Insulina glargina	Thr	Ile	<i>Gly</i>	Pro	Lys	Thr	<i>Arg &amp; Arg</i>