

Indice

CAPITOLO 1

Farmaci biotecnologici	1
F. Calabrese, L. Caffino	
Introduzione	1
Impatto dei farmaci biotecnologici.....	2
Classificazione dei farmaci biotecnologici.....	5
Confronto tra farmaci classici e biotecnologici	6
Effetti collaterali correlati all'assunzione di farmaci biotecnologici	8
Immunogenicità	9
Identificazione dei bersagli biologici	10
Bersagli proteici	11
Bersagli genetici e meccanicistici.....	11
Conclusioni	12
Bibliografia	12

CAPITOLO 2

Sviluppo dei farmaci biotecnologici	13
F. Calabrese, L. Caffino, L. Mologni	
Sviluppo di un farmaco: dalla ricerca alla commercializzazione.....	13
Identificazione del medical need.....	13
Dall'identificazione del principio attivo allo sviluppo.....	14
Sperimentazione clinica: fase 1	15
Sperimentazione clinica: fase 2	16
Sperimentazione clinica: fase 3	17
Processo di approvazione e immissione in commercio di un farmaco.....	19
Farmacovigilanza e monitoraggio: fase 4	20
Sviluppo e produzione di farmaci biotecnologici	21
Processo di produzione.....	22
Farmaci orfani	25
Farmaci biotecnologici e scadenza brevettuale: un nuovo mercato per i biosimilari.....	27
Biosimilari: simili, ma non identici	27
Criticità nei farmaci biosimilari	29
Quadro regolatorio dei biosimilari.....	31
Bibliografia	31

CAPITOLO 3**Farmaci biotecnologici per le malattie metaboliche** 33

G.D. Norata, N. Mitro

Diabete 33

Insulina 35

Insuline ad azione rapida e insuline ad azione lenta 36

Terapia cellulare per il diabete di tipo 1: Latindra 39

Inibitori del SGLT2: meccanismo, applicazioni cliniche e farmacocinetica 40

Agonisti del Glucagon-Like Peptide-1 Receptor (GLP-1R) 42

Bibliografia 46

CAPITOLO 4**Farmaci biotecnologici per le dislipidemie** 47

G.D. Norata, L. Calabresi

Introduzione 47

Inibitori di PCSK9 49

Inibitori di prima generazione 51

Inibitori di seconda generazione 52

Inibitori di terza generazione 53

Terapia genica 54

Farmaci che agiscono sull'apolipoproteina B-100 54

Farmaci per la riduzione della lipoproteina(A) 56

Farmaci che agiscono sulla proteina ANGPTL3 59

Evinacumab 59

Zodasiran 61

Farmaci che agiscono su APOC-III 61

Volanesorsen 61

Plozasiran 62

Bibliografia 62

CAPITOLO 5**Farmaci biotecnologici per le malattie del sistema nervoso centrale (SNC)** 65

E. Marcello, L. Caffino

Malattia di Alzheimer 65

Proteina tau: ruolo biologico e implicazioni nella neurodegenerazione 68

Terapia farmacologica 68

Conclusioni: anticorpi anti-A β e Alzheimer 76

Sclerosi multipla 76

Terapia farmacologica 77

Emicrania 93

Terapia farmacologica 94

Farmaci biotecnologici: la tossina botulinica 95

Farmaci biotecnologici che modulano il peptide correlato al gene della calcitonina 96

Bibliografia 102

CAPITOLO 6**Farmaci biotecnologici per le malattie oncologiche** 103

N. Mitro, L. Musazzi

Epidemiologia del cancro	103
Cancro e strategie terapeutiche mirate: il concetto di farmaco "agnostico"	104
Terapia del cancro: evoluzione e approcci	108
Ormonoterapia	110
Immunoterapia	113
Anticorpi per la terapia del cancro	118
Vaccini contro il cancro: prevenzione e trattamento	122
Prevenzione: vaccini anti-HPV e anti-HBV	122
Trattamento: vaccini oncologici	122
Bibliografia	123

CAPITOLO 7**Vaccini biotecnologici per le malattie infettive** 125

P. Sperandeo, R. Musumeci

Introduzione	125
Composizione e funzionamento del preparato vaccinale	127
Tipologie di vaccino	128
Vaccini problematici: il vaccino antinfluenzale	130
Vaccini con antigeni purificati	132
Vaccini ad anatossine (tossoidi)	133
Vaccini polisaccaridici	133
Vaccini ricombinanti	135
Vaccini ad acidi nucleici	136
Vaccini a DNA	136
Vaccini a mRNA	138
Vaccini a vettore virale	140
Vaccini epitope-based	143
Reverse vaccinology	144
Vaccini edibili	147
Principali vaccini antibatterici	148
Principali vaccini antivirali	150
Bibliografia	152

CAPITOLO 8**Terapia cellulare e cellule staminali** 153

M. Aureli, F. Bifari, G. Lunghi, M. Serafini

Terapia cellulare, medicina rigenerativa e terapie avanzate	153
Peculiarità farmacocinetiche e farmacodinamiche	154
Terapie cellulari con cellule staminali	157
Cellule staminali pluripotenti: tipologie e applicazioni	158
Caratteristiche della pluripotenza	160
Processo di differenziamento delle cellule staminali pluripotenti	162

Co-coltura con cellule feeder.....	163
Ingegneria genetica e cellule staminali.....	165
Terapie cellulari: meccanismi d'azione.....	166
Terapie geniche e cellulari combinate.....	168
Cellule staminali e organoidi	169
Terapie cellulari utilizzate sull'uomo	171
Trapianto di midollo osseo	171
Trapianto di cute.....	172
Terapia rigenerativa della cornea.....	173
Terapie in fase di studio.....	174
Altre terapie	174
Bibliografia	175

CAPITOLO 9

Terapia genica e farmaci con tecnologia a RNA..... 177

A. Frasca, F. Rusconi, M. Serafini

Introduzione	177
Un viaggio lungo cinquant'anni.....	178
Elementi essenziali della terapia genica.....	179
Vettori di espressione nella terapia genica: caratteristiche ed evoluzione.....	181
Vettori di espressione e fattori che influenzano il successo della terapia genica.....	183
Integrare o non integrare?	184
Cellule bersaglio e approcci di somministrazione	184
Applicazioni cliniche della terapia genica	185
Terapia genica della beta-talassemia trasfusione-dipendente (TDT).....	186
Terapia genica della sindrome di Duchenne	187
Terapia genica dell'ADA-SCID.....	188
Terapia genica per la leucodistrofia metacromatica.....	189
Esempi di terapia genica con somministrazione <i>in vivo</i>	190
Terapie a RNA..... 191	
Meccanismi molecolari alla base dell'effetto terapeutico delle terapie a RNA	191
Modulazione del metabolismo dell'RNA: oligonucleotidi antisense GAPmers.....	192
Somministrazione esogena di trascritti in mRNA	194
Bibliografia	196

CAPITOLO 10

Terapie CAR-T..... 197

E. Borroni, G. Poli, M. Serafini

Introduzione	197
Cenni storici.....	198
Fasi del processo di generazione delle CAR-T	200
Struttura del recettore chimerico per antigene (CAR).....	202

Espressione del recettore chimerico CAR: strategie e problematiche	204
Sfide attuali e opportunità emergenti delle terapie CAR-T	206
Potenziale terapeutico delle cellule CAR-T	207
Effetti collaterali	208
Richieste non soddisfatte delle terapie CAR-T	210
Prospettive future: CAR-T ON/OFF	211
Bibliografia	213

CAPITOLO 11

Biotecnologie, infertilità e procreazione medica assistita

V. Savasi, D. Passoni, M. Santapaola

Infertilità	215
Definizioni ed epidemiologia	215
Cause di infertilità	216
Diagnostica	216
Tecniche di riproduzione assistita	219
Tecniche di primo livello	220
Tecniche di secondo livello	222
Tecniche di terzo livello	226
Test preimpianto	227
Fecondazione eterologa	227
Complicanze	228
Bibliografia	230

CAPITOLO 12

Biotecnologie nella diagnostica

R. Meneveri, A. Bentivegna, F. Raimondo, B. Savino, V. Tritto

Introduzione	231
Obiettivo delle biotecnologie nella diagnostica molecolare	233
Diagnostica molecolare	234
Genetica molecolare	234
Analisi citogenetiche e citogenomiche	239
Citogenetica classica	240
Citogenetica molecolare	243
Citogenomica	245
Immunodiagnostica	248
Gli anticorpi: reagenti alla base dell'immunodiagnostica	248
Principali tecniche di immunodiagnostica	251
Approcci diagnostici avanzati che sfruttano le biotecnologie	262
Bibliografia	264

Indice analitico

Farmaci biotecnologici

F. Calabrese, L. Caffino

Introduzione

I farmaci biologici rappresentano un'evoluzione significativa nel campo della farmacologia e della medicina moderna. Questi medicinali, a differenza dei farmaci chimici tradizionali, derivano da organismi viventi o da loro tessuti e includono una vasta gamma di prodotti terapeutici, dai vaccini agli anticorpi monoclonali, dalle terapie a base di cellule alle proteine ricombinanti. L'importanza dei farmaci biologici risiede nella loro capacità di trattare malattie che, fino a pochi decenni fa, erano considerate incurabili o il cui decorso era difficilmente gestibile con le terapie convenzionali. Grazie alla loro specificità e alla capacità di interagire con meccanismi biologici complessi, i farmaci biologici offrono soluzioni terapeutiche mirate e, in molti casi, personalizzate, migliorando notevolmente la qualità della vita dei pazienti affetti da patologie gravi.

La produzione di farmaci biologici è un processo altamente sofisticato che implica l'utilizzo di cellule viventi, come batteri, lieviti o cellule di mammifero, coltivate in ambienti controllati. Queste cellule sono programmate per produrre specifiche molecole terapeutiche, come proteine, anticorpi o enzimi, attraverso l'introduzione di geni codificanti per tali molecole. Questo processo avviene tramite tecnologie avanzate come la fermentazione, la coltura cellulare e la purificazione delle proteine.

I farmaci biotecnologici rappresentano un sottoinsieme dei farmaci biologici e sono caratterizzati dall'impiego di tecnologie avanzate di ingegneria genetica per la loro produzione. Questi farmaci non solo derivano da organismi viventi, ma sono il risultato di sofisticati interventi di manipolazione genetica, che consentono di produrre molecole terapeutiche con una precisione e una specificità senza precedenti. L'utilizzo del DNA ricombinante è una delle tecnologie chiave nella produzione di farmaci biotecnologici. Questa tecnica prevede l'inserimento di geni umani o animali all'interno di organismi semplici come batteri o lieviti, che vengono poi coltivati per produrre le proteine desiderate. Queste proteine possono essere utilizzate per sostituire proteine mancanti o difettose nel corpo umano, trattare malattie genetiche o modulare il sistema immunitario. Tra gli esempi più emblematici di questo tipo di farmaci figura l'insulina ricombinante, utilizzata per il trattamento del diabete. Prima dell'avvento delle tecnologie moderne, l'insulina veniva estratta da tessuti animali, un processo inefficiente e soggetto a numerose variabili. Con lo sviluppo della tecnologia del DNA ricombinante, i geni umani che codificano per l'insulina sono stati inseriti nei batteri, che producono insulina in grandi quantità, successivamente purificata e utilizzata come farmaco. Questo ha non solo migliorato la sicurezza e l'efficacia del trattamento, ma ha anche reso l'insulina ampiamente disponibile.

Un altro importante contributo della biotecnologia è stato lo sviluppo degli anticorpi monoclonali. Questi farmaci sono prodotti utilizzando cellule di mammifero geneticamente modificate, che vengono programmate per produrre anticorpi specifici contro antigeni presenti sulle cellule tumorali o su altre cellule bersaglio. Gli anticorpi monoclonali (mAb) possono essere utilizzati per inibire specifici segnali cellulari che promuovono la crescita tumorale, per marcare le cellule tumorali e renderle più visibili al sistema immunitario, o per trasportare tossine direttamente alle cellule tumorali, riducendo al minimo i danni ai tessuti sani. Tra gli mAb un esempio è il trastuzumab che viene utilizzato nel trattamento del cancro al seno HER2-positivo: legandosi al recettore HER2 sulla superficie delle cellule tumorali inibisce la loro proliferazione e stimola il sistema immunitario a distruggerle.

Sebbene i termini “farmaci biologici” e “farmaci biotecnologici” vengano talvolta usati in modo intercambiabile, esistono differenze fondamentali tra i due. Una delle principali differenze risiede nella complessità del processo produttivo. Mentre i farmaci biologici tradizionali possono essere ottenuti attraverso processi più semplici e naturali, i farmaci biotecnologici richiedono un alto grado di manipolazione genetica e tecnologica per ottenere il prodotto finale. Questo permette ai farmaci biotecnologici di essere altamente specifici e di avere applicazioni terapeutiche mirate, che non sarebbero possibili con i farmaci biologici tradizionali. I progressi nella biotecnologia hanno, infatti, permesso di sviluppare terapie altamente personalizzate, che non solo trattano i sintomi delle malattie, ma intervengono direttamente sulle cause molecolari alla base delle patologie. Le applicazioni terapeutiche dei farmaci biologici e biotecnologici sono estremamente variegata e comprendono il trattamento di malattie oncologiche, autoimmuni, infettive e genetiche. Per esempio, nel campo dell'oncologia, le terapie mirate, come gli anticorpi monoclonali e gli inibitori delle chinasi, agiscono su specifici meccanismi cellulari che promuovono la crescita tumorale, riducendo al contempo gli effetti collaterali associati alle terapie tradizionali come la chemioterapia. Questi farmaci hanno migliorato significativamente la prognosi per molti pazienti affetti da tumori che un tempo erano considerati incurabili. Nel trattamento delle malattie autoimmuni come artrite reumatoide e malattia di Crohn, i farmaci biotecnologici come gli mAb anti-TNF (fattore di necrosi tumorale) hanno dimostrato di essere estremamente efficaci nel ridurre l'infiammazione e i danni ai tessuti, migliorando la qualità della vita dei pazienti.

Le prospettive future per i farmaci biologici e biotecnologici sono estremamente promettenti. La ricerca continua a esplorare nuove applicazioni terapeutiche, tra cui la terapia genica, che mira a correggere le mutazioni genetiche alla base di molte malattie ereditarie. Inoltre, lo sviluppo di nuove tecnologie, come la CRISPR/Cas9 per l'editing genetico, promette di espandere ulteriormente le possibilità di intervento terapeutico, permettendo di correggere direttamente i difetti genetici responsabili delle malattie.

I farmaci biologici e biotecnologici rappresentano l'avanguardia della medicina moderna, offrendo nuove soluzioni terapeutiche per malattie che fino a poco tempo fa erano considerate incurabili. Grazie alla loro specificità, alla capacità di modulare i processi biologici a livello molecolare e alla possibilità di sviluppare terapie personalizzate, questi farmaci stanno trasformando il modo in cui trattiamo una vasta gamma di patologie. Tuttavia, con queste innovazioni arrivano anche nuove sfide. La complessità della produzione, i costi elevati e la necessità di rigorosi controlli di qualità sono solo alcune delle difficoltà che l'industria farmaceutica deve affrontare.

Impatto dei farmaci biotecnologici

Dagli anni '80 in poi, l'introduzione delle biotecnologie nel settore farmaceutico ha innescato una trasformazione profonda e duratura che ha influenzato radicalmente non solo le strategie di ricerca e sviluppo, ma anche la natura stessa dei farmaci prodotti. Prima di questo periodo, lo

sviluppo di farmaci era principalmente basato su processi chimici tradizionali e l'obiettivo era sintetizzare molecole piccole e relativamente semplici per trattare una varietà di patologie. Lo sviluppo di nuovi farmaci era un processo lungo e incerto, basato principalmente su tentativi ed errori. L'avvento delle biotecnologie ha modificato profondamente la ricerca farmaceutica. L'applicazione delle tecniche biotecnologiche ha aperto la strada all'uso terapeutico di macromolecole, come proteine, anticorpi monoclonali e acidi nucleici, che sono in grado di interagire in modo molto più specifico con i bersagli biologici, e l'avanzamento tecnologico ha permesso una maggiore comprensione dei meccanismi biologici che governano le malattie. Inoltre, l'introduzione di nuovi strumenti per la diagnosi precoce e la personalizzazione delle terapie, come i microarray di DNA o RNA, hanno permesso di identificare precocemente le condizioni patologiche, migliorando significativamente le possibilità di prognosi e trattamento. Inoltre, l'uso di radiotraccianti e altre tecnologie di imaging avanzate hanno reso possibile monitorare l'evoluzione delle malattie con una precisione senza precedenti. Si sono, quindi, iniziati a sviluppare farmaci complessi che agiscono direttamente sui meccanismi molecolari alla base delle malattie, offrendo trattamenti più mirati e, in molti casi, più efficaci. Inoltre, anche il processo di sviluppo dei nuovi farmaci è diventato più rapido ed efficiente in quanto, grazie alle banche dati genetiche e alla bioinformatica, le molecole che hanno il potenziale per diventare nuovi farmaci possono essere identificate con maggiore rapidità e precisione, riducendone i costi associati.

Per esempio, sono stati sviluppati vaccini più sicuri che hanno ridotto drasticamente l'incidenza di malattie infettive gravi. Inoltre, le biotecnologie hanno permesso di sviluppare farmaci per il trattamento di disfunzioni metaboliche a base genetica, migliorando significativamente la qualità della vita dei pazienti affetti da queste condizioni. Come già accennato, un'altra area in cui le biotecnologie hanno avuto un impatto significativo è quella dei farmaci antitumorali. I nuovi farmaci biotecnologici non solo sono più efficaci nel colpire le cellule tumorali, ma sono anche meno dannosi per l'organismo rispetto ai trattamenti tradizionali come la chemioterapia. Questo è possibile grazie alla capacità di queste molecole di agire in modo specifico sui meccanismi molecolari che sono alla base della crescita tumorale. Le biotecnologie hanno anche portato allo sviluppo di stimolatori delle difese immunitarie, utili per trattare condizioni in cui il sistema immunitario è compromesso, come nel caso delle malattie autoimmuni o in seguito a trattamenti come la chemioterapia. Questi farmaci sono in grado di modulare l'attività del sistema immunitario, aumentando la sua capacità di combattere le infezioni o riducendo la sua iperattività in caso di malattie autoimmuni.

L'analisi dell'andamento delle approvazioni da parte della Food and Drug Administration (FDA), agenzia regolatoria statunitense, negli ultimi decenni mostra chiaramente come il campo dei farmaci biotecnologici sia in continua espansione. Nel 2023, il Centro per la valutazione e la ricerca sui farmaci (CDER) della FDA ha approvato 55 nuovi farmaci, un numero significativamente più alto rispetto all'anno precedente¹ (Fig. 1.1). Questo dato evidenzia un trend di crescita costante nel numero di nuovi farmaci che raggiungono il mercato, indicando un impegno sempre maggiore nella ricerca e sviluppo di nuove terapie.

Il grafico delle approvazioni FDA mostra un aumento costante delle nuove entità molecolari (NMEs) e delle licenze per prodotti biologici (BLAs) nel corso degli ultimi trent'anni. Questa crescita riflette non solo un ampliamento delle opzioni terapeutiche disponibili, ma anche un miglioramento delle tecniche di ricerca e sviluppo che permettono di identificare e portare sul mercato nuovi farmaci in modo più efficiente. La media decennale delle nuove approvazioni CDER ora si attesta a 46 per anno, il livello più alto registrato negli ultimi vent'anni, dimostrando il continuo progresso del settore farmaceutico.

Nel 2023, le approvazioni dei farmaci biotecnologici hanno coperto un'ampia gamma di aree terapeutiche (Fig. 1.2), con l'oncologia che ha mantenuto il primato come campo con il maggior numero di nuove approvazioni. Dei 55 farmaci approvati, 13 erano destinati al trattamento del

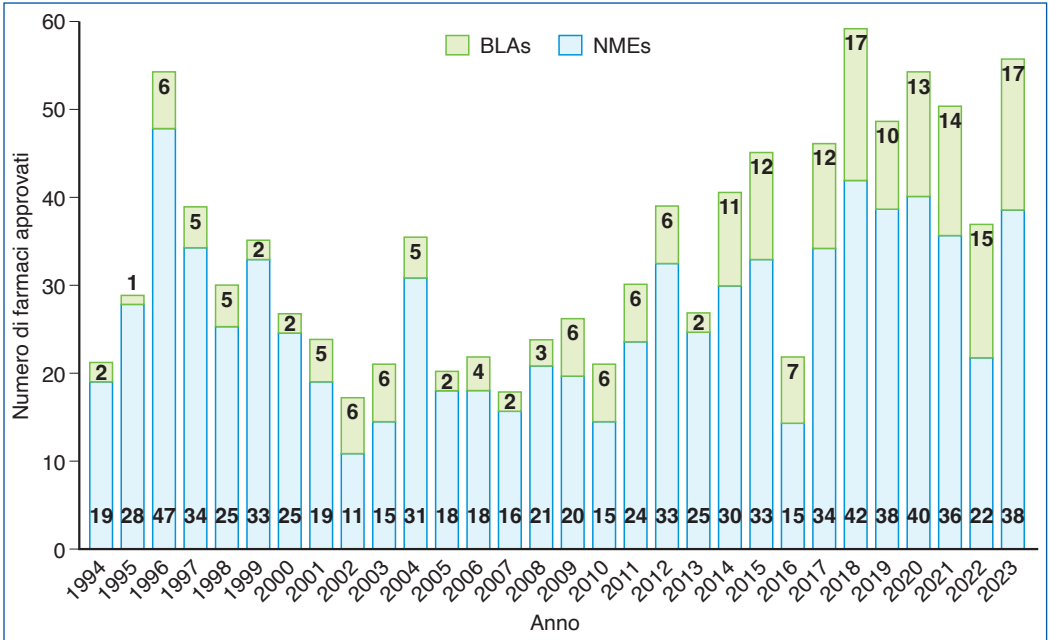


Figura 1.1 Nuove approvazioni FDA degli ultimi trent'anni. Approvazioni annuali di nuove entità molecolari (NME) e domande di licenza per prodotti biologici (BLA) approvate dal Center for Drug Evaluation and Research (CDER) della FDA.

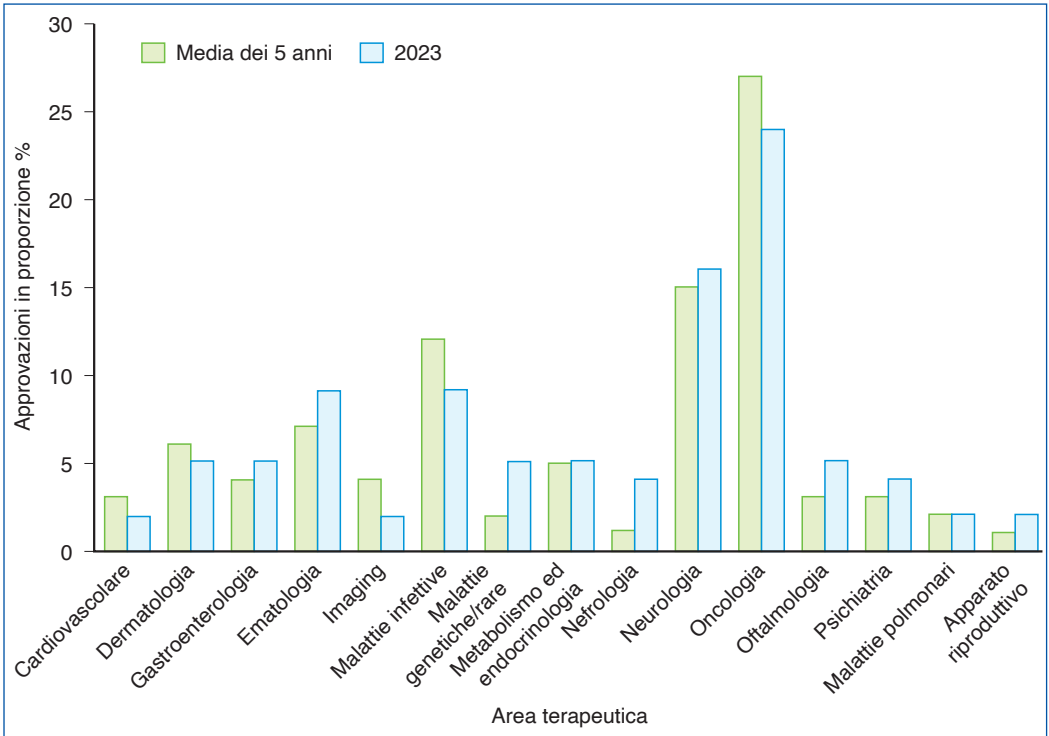


Figura 1.2 Approvazioni CDER per area terapeutica.

cancro, rappresentando il 24% del totale. La neurologia è stata la seconda area terapeutica più rappresentata, con 9 nuovi farmaci approvati, pari al 16% del totale. Questo dato è in linea con l'aumento dell'incidenza di malattie neurodegenerative come il morbo di Alzheimer e il morbo di Parkinson, una sfida crescente per i sistemi sanitari di tutto il mondo. Le malattie infettive e l'ematologia sono al terzo posto, ciascuna con 5 nuove approvazioni, rappresentando il 9% del totale. L'interesse per le malattie infettive è stato particolarmente accentuato dalla pandemia di COVID-19, che ha evidenziato la necessità di sviluppare nuovi trattamenti antivirali e vaccini. Allo stesso modo, l'ematologia continua a essere un campo di grande rilevanza, con nuove terapie sviluppate per trattare condizioni come le leucemie e i linfomi.

L'evoluzione delle biotecnologie ha trasformato il modo in cui vengono sviluppati i farmaci, portando a una nuova era della medicina in cui le terapie sono sempre più personalizzate e mirate. Il crescente numero di approvazioni di farmaci biotecnologici da parte della FDA è un chiaro indicatore del progresso raggiunto in questo campo, con un aumento costante delle nuove entità molecolari e dei prodotti biologici che raggiungono il mercato. Questo trend positivo è destinato a continuare, con l'aspettativa che le biotecnologie continuino a rivoluzionare il trattamento di una vasta gamma di malattie, migliorando significativamente la qualità della vita dei pazienti e offrendo nuove speranze per il futuro della medicina.

Classificazione dei farmaci biotecnologici

La classificazione dei farmaci biotecnologici in base al meccanismo di azione e alla natura della loro struttura molecolare è essenziale per comprendere il loro funzionamento e le loro applicazioni cliniche. Di seguito sono riportate le diverse classi di farmaci biotecnologici a oggi presenti in commercio:

- Le *proteine ricombinanti* sono state tra i primi farmaci biotecnologici a essere sviluppati e approvati. Inclondono ormoni come l'insulina, l'ormone della crescita (GH), fattori di crescita (come EPO per l'eritropoiesi), fattori della coagulazione (come il fattore VIII per l'emofilia), e vari enzimi utilizzati per la terapia sostitutiva enzimatica. La produzione di queste proteine avviene attraverso l'ingegneria genetica, che prevede l'inserimento del gene codificante per la proteina desiderata all'interno di un sistema ospite, come un batterio o una cellula eucariotica. A seguito della sua espressione, la proteina deve essere purificata e formulata con eccipienti adatti per garantire la sua stabilità e attività terapeutica.
- Gli *anticorpi monoclonali* (mAb) rappresentano una delle classi più significative di farmaci biotecnologici. Questi sono progettati per riconoscere e legarsi specificamente a un determinato antigene presente su cellule patogene o tumorali. Agiscono innescando una risposta immunitaria che può includere la citotossicità cellulare o il blocco di segnali di crescita. Questi anticorpi possono essere utilizzati da soli o coniugati con farmaci citotossici (ADC) per migliorare la loro efficacia terapeutica. Il 2023 ha visto una continua espansione di questa classe di farmaci, con il 22% delle nuove approvazioni FDA attribuite a mAb.
- I *peptidi*, sia ricombinanti che sintetici, rappresentano un'altra importante categoria di farmaci biotecnologici. Questi frammenti proteici sono progettati per interagire con specifici recettori cellulari o per agire come mimetici di proteine naturali. Nel 2023, c'è stata una notevole crescita nel numero di approvazioni di farmaci a base di peptidi e oligonucleotidi (TIDES), con un totale di 9 nuovi farmaci autorizzati. Questi includono anche molecole come aptameri RNA, piccole molecole a RNA che interferiscono con l'espressione genica silenziandola (siRNA) e molecole antisenso, brevi sequenze nucleotidiche sintetiche a singolo filamento di

DNA che legano il RNA messaggero bersaglio inducendone la degradazione. Questi farmaci rappresentano una nuova generazione di terapie geniche capaci di silenziare specifici geni associati a malattie.

- Le *molecole ingegnerizzate*, che comprendono proteine di fusione, frammenti di mAb, liposomi e polimeri, sono progettate per migliorare la biodisponibilità, la stabilità e la specificità dei farmaci. Queste molecole offrono vantaggi significativi, come una ridotta immunogenicità e una maggiore capacità di penetrare nei tessuti target, rendendole particolarmente utili in oncologia e nelle malattie autoimmuni.
- Le terapie *cellulari e tissutali* sono una delle aree più innovative e promettenti della biotecnologia medica. Queste terapie utilizzano cellule modificate o ingegnerizzate per riparare o sostituire tessuti danneggiati, o per combattere malattie come il cancro. Un esempio emblematico è l'approvazione nel 2023 della prima terapia cellulare modificata con CRISPR-Cas9, Casgevy, utilizzata per trattare l'anemia falciforme. Questo rappresenta un importante passo avanti nella medicina di precisione, aprendo la strada a nuove applicazioni della terapia genica in altre malattie genetiche.
- Le terapie *geniche* mirano a trattare o prevenire malattie correggendo difetti genetici a livello molecolare. Queste includono oligonucleotidi antisenso, inibitori dell'RNA e altre tecnologie emergenti che permettono di modulare l'espressione genica in modo specifico. Il 2023 ha visto l'approvazione di diverse nuove terapie geniche, inclusi trattamenti innovativi per malattie genetiche rare e complesse. La terapia genica è destinata a diventare una componente centrale della medicina personalizzata, con potenziali applicazioni che spaziano dall'oncologia alle malattie neurologiche.
- I vaccini *ricombinanti e ingegnerizzati* a livello molecolare rappresentano un'altra importante categoria di farmaci biotecnologici. Questi vaccini sono progettati per stimolare una risposta immunitaria specifica contro patogeni o cellule tumorali, utilizzando antigeni prodotti attraverso tecniche di DNA ricombinante. Nel 2023, la FDA ha approvato due nuovi vaccini preventivi e un vaccino post-esposizione, evidenziando l'importanza continua dei vaccini nella prevenzione delle malattie infettive e nel trattamento delle malattie oncologiche.

Confronto tra farmaci classici e farmaci biotecnologici

Il confronto tra farmaci classici e farmaci biotecnologici mette in luce differenze significative sotto vari aspetti, inclusi la complessità strutturale, il profilo delle impurezze, la stabilità e i costi di produzione. Queste differenze sono legate principalmente alla natura delle molecole coinvolte e ai processi di produzione:

- *Dimensioni*. I farmaci classici, come molecole chimiche di piccole dimensioni, sono relativamente semplici da caratterizzare e produrre. Con una massa molecolare che va dai 100 ai 1000 dalton, la loro struttura è ben definita e può essere identificata con precisione tramite tecniche strumentali avanzate come la spettrometria di massa e la risonanza magnetica nucleare. Questi farmaci presentano una stabilità prevedibile e sono generalmente resistenti alle variazioni di temperatura. Al contrario, i farmaci biotecnologici, come le proteine ricombinanti e gli anticorpi monoclonali, sono macromolecole molto più grandi, con masse molecolari che possono variare dai 5 ai 200 kDa. La loro struttura è molto complessa e spesso eterogenea, influenzata dal tipo di modifiche post-traduzionali come la glicosilazione, l'ossidazione o la deaminazione. Queste variazioni possono avvenire durante il processo di sintesi proteica nei

sistemi biologici, generando una gamma di molecole quasi identiche ma con differenze minime (microeterogeneità strutturale) che possono avere un impatto significativo sull'efficacia e sulla sicurezza del farmaco.

- *Processo produttivo.* Per i farmaci di sintesi chimica, il processo produttivo è standardizzato e replicabile, mentre i farmaci biotecnologici richiedono l'uso di sistemi biologici complessi come cellule di mammifero, batteri o lieviti. Per i farmaci biotecnologici la complessità del processo produttivo, costituita dalla variabilità intrinseca associata alla produzione biologica, influisce direttamente sulle caratteristiche del farmaco. Anche piccoli cambiamenti nelle condizioni di coltura o nei processi di purificazione possono portare a variazioni significative nella struttura e nell'efficacia del farmaco. La massima "il processo è il prodotto" riflette questa realtà: anche piccole variazioni possono influenzare significativamente il profilo di efficacia e sicurezza del farmaco, aumentando la difficoltà e i costi di produzione. Infatti, i costi di produzione dei farmaci biotecnologici sono molto più elevati rispetto a quelli dei farmaci classici. Questo è dovuto alla complessità dei processi di produzione, che coinvolgono sistemi biologici, richiedono condizioni di coltura e produzione altamente specifiche per garantire la qualità e l'efficacia del prodotto finale e necessitano di adattamenti specifici delle condizioni per ogni prodotto. L'importanza di monitorare e controllare rigorosamente ogni fase del processo produttivo aumenta ulteriormente i costi e la complessità dello sviluppo su larga scala. Questo aspetto diventa ancora più rilevante con l'avvicinarsi della scadenza dei brevetti per i farmaci biotecnologici, poiché la produzione di versioni biosimilari richiede una profonda comprensione e replicazione del processo originale. La sfida consiste nel garantire che il biosimilare sia altrettanto sicuro ed efficace quanto il prodotto originario, nonostante le inevitabili variazioni nel processo produttivo.
- *Purezza.* I farmaci classici sono generalmente puri al 100% o molto vicini a questa purezza, con impurezze che sono facilmente identificabili e quantificabili. La produzione standardizzata di questi farmaci, spesso tramite metodi chimici, permette una riproducibilità elevata e l'assenza di contaminanti biologici. Al contrario, nei farmaci biotecnologici la proteina prodotta non è mai pura al 100%. Questi farmaci possono contenere una piccola quota di forme tronche, deaminate o modificate della proteina originale, che rappresentano impurezze difficili da eliminare completamente. Tuttavia, l'eterogeneità è accettabile se le impurezze sono riproducibili da lotto a lotto e se non risultano tossiche.
- *Stabilità.* A differenza dei farmaci classici, che sono generalmente stabili e resistenti alle variazioni di calore, i farmaci biotecnologici sono spesso sensibili al calore e la loro stabilità può essere difficile da prevedere. Essendo composti da proteine o altre molecole biologiche complesse, questi farmaci sono spesso instabili e richiedono condizioni di conservazione specifiche, come temperature molto basse, per mantenere la loro efficacia. La deperibilità rappresenta un problema non solo nella fase di stoccaggio, ma anche durante il trasporto e la distribuzione, richiedendo una catena del freddo ben gestita e costosa.
- *Via di somministrazione.* La maggior parte dei farmaci biotecnologici non può essere somministrata per via orale, poiché le proteine e altre molecole biologiche sarebbero degradate dagli enzimi digestivi prima di poter esercitare il loro effetto terapeutico. Di conseguenza, questi farmaci devono essere somministrati attraverso iniezioni sottocutanee, intramuscolari o endovenose, che possono essere meno convenienti e più dolorose per i pazienti, riducendo l'aderenza al trattamento.
- *Immunogenicità.* Un aspetto cruciale che distingue i farmaci biotecnologici dai farmaci classici è il rischio di immunogenicità, ovvero la capacità di un farmaco di indurre una risposta immunitaria. Anche i farmaci biotecnologici progettati per essere identici a proteine umane possono provocare reazioni immunitarie se presentano caratteristiche come la formazione di

aggregati proteici. Queste reazioni possono manifestarsi come risposte immuni senza conseguenze cliniche o reazioni autoimmuni che possono compromettere l'efficacia del farmaco o, in rari casi, causare gravi effetti collaterali.

Effetti collaterali correlati all'assunzione di farmaci biotecnologici

Gli effetti collaterali legati all'assunzione di farmaci biotecnologici rappresentano una delle principali sfide nel loro utilizzo clinico. Questi effetti indesiderati possono derivare da diversi fattori, inclusi il meccanismo d'azione del farmaco, l'espressione del bersaglio in tessuti non desiderati, l'interazione con antigeni non bersaglio e reazioni di tipo immunologico.

Uno degli effetti collaterali principali associati ai farmaci biotecnologici è legato al loro meccanismo d'azione farmacologico. Nonostante molti di questi farmaci siano progettati per colpire specifiche proteine o recettori, se il bersaglio terapeutico è presente anche in tessuti sani, l'attivazione o l'inibizione di questi bersagli può portare a effetti collaterali indesiderati. Per esempio, gli mAb utilizzati per il trattamento di tumori possono legarsi a recettori che, oltre a essere presenti nelle cellule tumorali, si trovano anche in tessuti sani. Questo è particolarmente rilevante per i farmaci che si legano ai recettori dei fattori di crescita o a proteine coinvolte nella regolazione del sistema immunitario, dove l'inibizione o l'attivazione non specifica può causare tossicità significativa.

Un esempio classico è l'uso di inibitori di EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) nel trattamento del cancro. EGFR è espresso non solo nelle cellule tumorali, ma anche in cellule epiteliali sane della pelle e del tratto gastrointestinale. Il legame del farmaco con i recettori espressi su tessuti sani può portare a effetti collaterali come eruzioni cutanee e diarrea, comuni nei pazienti trattati con questi farmaci.

Un ulteriore problema riguarda la tossicità off-target, ossia l'interazione del farmaco biotecnologico con antigeni diversi da quelli bersaglio. Questo fenomeno si verifica quando un farmaco si lega a un antigene che non è quello per cui è stato progettato, provocando effetti collaterali non previsti. Un esempio può essere rappresentato dagli mAb, che sono progettati per legarsi specificamente a una proteina bersaglio, ma in alcuni casi possono legarsi anche a proteine simili o condividere epitopi comuni con antigeni non desiderati, causando danni a tessuti sani.

Gli effetti collaterali di tipo *immunologico* sono i più frequenti e complessi da gestire. Questi possono includere la formazione di anticorpi neutralizzanti e reazioni di ipersensibilità. La formazione di *anticorpi neutralizzanti* è un fenomeno immunologico in cui il sistema immunitario del paziente riconosce il farmaco biotecnologico come un antigene estraneo e produce anticorpi contro di esso. Questi anticorpi possono legarsi al farmaco, impedendogli di raggiungere il suo bersaglio o riducendone l'efficacia. Può essere, quindi, necessario interrompere il trattamento o cambiare farmaco, e ciò può rappresentare un problema significativo nel trattamento di malattie croniche che richiedono somministrazioni ripetute. Per esempio, nei pazienti affetti da sclerosi multipla trattati con interferone β , si possono sviluppare anticorpi neutralizzanti che riducono l'efficacia del trattamento, costringendo a cambiare terapia o a utilizzare dosi più elevate, con un aumento del rischio di insorgenza di altri effetti collaterali.

Le reazioni di *ipersensibilità* sono un altro tipo di risposta immunologica avversa ai farmaci biotecnologici. Queste reazioni possono variare da eruzioni cutanee lievi a gravi reazioni anafilattiche che mettono a rischio la vita del paziente. Le reazioni di ipersensibilità sono spesso legate all'immunogenicità del prodotto, ovvero la capacità del farmaco di stimolare una risposta immu-

nitaria. Anche i farmaci progettati per essere altamente specifici e simili alle proteine umane possono, in certe circostanze, indurre reazioni immunitarie. Questi effetti collaterali immunologici possono essere particolarmente problematici perché, oltre a compromettere l'efficacia del trattamento, possono anche comportare rischi significativi per la salute del paziente, richiedendo un monitoraggio continuo e, in alcuni casi, l'adozione di terapie concomitanti per gestire le reazioni immunitarie.

IMMUNOGENICITÀ

L'immunogenicità dei farmaci biotecnologici è altamente variabile e dipende da numerosi fattori, tra cui la struttura del farmaco, il processo di produzione, la formulazione, il metodo di somministrazione e le caratteristiche individuali del paziente. Ogni farmaco biotecnologico presenta un profilo di immunogenicità unico, che può influenzare l'efficacia del trattamento e il rischio di insorgenza di effetti collaterali.

Gli mAb, utilizzati estensivamente in terapia per il trattamento di diverse malattie, sono un esempio di farmaci biotecnologici che possono indurre una risposta immunitaria. Essi sono caratterizzati da una specificità elevata per un singolo epitopo, ma sono anche suscettibili all'immunogenicità a seconda della loro origine; questo rischio è particolarmente elevato per mAb di origine non umana o parzialmente umana. Gli anticorpi monoclonali murini, che contengono porzioni significative di sequenze amminoacidiche derivate da topi, sono stati i primi a essere sviluppati, ma sono stati rapidamente superati dai loro omologhi umanizzati o completamente umani. Questo perché gli anticorpi murini presentano un alto rischio di essere riconosciuti come estranei dal sistema immunitario umano, portando alla formazione di anticorpi anti-farmaco che possono neutralizzare l'efficacia terapeutica del trattamento. Infatti, si stima che quasi il 90% dei pazienti trattati con anticorpi monoclonali murini sviluppino una risposta anticorpale, rendendoli non idonei per l'uso terapeutico. Gli anticorpi umanizzati o completamente umani, sviluppati attraverso tecnologie di DNA ricombinante, hanno ridotto significativamente l'immunogenicità, sebbene non l'abbiano eliminata del tutto. Infatti, anche questi anticorpi possono indurre una risposta immunitaria, soprattutto in trattamenti a lungo termine o quando somministrati per via sottocutanea.

Le proteine ricombinanti, un'altra classe fondamentale di farmaci biotecnologici, mostrano una notevole variabilità nell'immunogenicità tra i diversi pazienti. Questo può essere influenzato da vari fattori, tra cui la purezza della proteina, la presenza di varianti o forme tronche, la glicosilazione e altre modifiche post-traduzionali. Per esempio, l'interferone β , utilizzato nel trattamento della sclerosi multipla, mostra un'immunogenicità variabile a seconda del metodo di produzione. Infatti se l'interferone viene sintetizzato in *Escherichia coli*, ed è quindi privo di glicosilazione, mostra maggiore immunogenicità rispetto a interferone prodotto in cellule di mammifero e quindi correttamente glicosilato. Questa differenza nella risposta anticorpale è significativa, in quanto il primo induce una risposta anticorpale nel 15-45% dei pazienti, mentre il secondo induce una risposta in meno del 10% dei soggetti trattati².

Un altro esempio di farmaco biotecnologico è l'etanercept, un inibitore del fattore di necrosi tumorale α (TNF α), utilizzato nel trattamento di diverse malattie autoimmuni come l'artrite reumatoide e la psoriasi. Etanercept è una proteina di fusione ottenuta combinando il recettore umano p75 del TNF α con la porzione Fc di un anticorpo. Questa proteina ricombinante, prodotta in cellule ovariche di criceto cinese (CHO), è generalmente ben tollerata, ma può indurre la formazione di anticorpi neutralizzanti contro etanercept in alcuni pazienti. Questa reazione può ridurre la sua efficacia terapeutica, richiedendo un monitoraggio continuo e, in alcuni casi, un cambiamento di terapia.

In particolare, l'immunogenicità di un farmaco biotecnologico può essere influenzata da diversi fattori, che possono essere suddivisi in tre categorie principali:

- *Fattori legati alla proteina*
 - *Purezza della proteina.* Impurezze o contaminanti presenti nella preparazione della proteina possono aumentare l'immunogenicità. Per esempio, varianti della proteina, come forme tronche o proteine parzialmente denaturate, possono essere riconosciute come estranee dal sistema immunitario.
 - *Glicosilazione.* La glicosilazione è un processo cruciale per la funzionalità delle proteine ricombinanti. Se una proteina ricombinante non è correttamente glicosilata, può essere riconosciuta come estranea dal sistema immunitario, aumentando il rischio di una risposta immunitaria.
 - *Modifiche post-traduzionali.* Oltre alla glicosilazione, altre modifiche post-traduzionali come l'ossidazione o la deaminazione possono influenzare l'immunogenicità della proteina.
- *Fattori legati al prodotto*
 - *Contaminazioni e impurezze.* Le contaminazioni durante il processo di produzione e purificazione possono contribuire all'immunogenicità del prodotto. Questo include presenza di DNA della cellula ospite, proteine derivate dalla cellula ospite, contaminanti microbiologici e prodotti di degradazione.
 - *Formulazione e stoccaggio.* La stabilità del prodotto finale è influenzata dalla formulazione e dalle condizioni di stoccaggio. Per esempio, un prodotto che dovrebbe essere conservato a -80°C ma che viene mantenuto a temperature più alte potrebbe degradarsi e indurre una risposta immunitaria più intensa.
- *Fattori legati alla somministrazione*
 - *Via di somministrazione.* La via di somministrazione ha un impatto significativo sull'immunogenicità. La somministrazione sottocutanea è generalmente associata a una maggiore immunogenicità rispetto alla somministrazione endovenosa.
 - *Dosaggio e durata del trattamento.* Trattamenti a lungo termine o con dosaggi elevati possono aumentare il rischio di immunogenicità. Farmaci somministrati una sola volta possono indurre una risposta anticorpale meno rilevante rispetto a farmaci somministrati frequentemente.

Identificazione dei bersagli biologici

Un aspetto cruciale della ricerca biomedica è rappresentato dall'identificazione dei bersagli biologici e dal loro utilizzo nello sviluppo di farmaci, soprattutto nel contesto delle biotecnologie farmaceutiche. Un bersaglio biologico è la molecola all'interno dell'organismo, generalmente una proteina, che svolge un ruolo chiave nel mantenere una funzione fisiologica o, in casi patologici, nello sviluppo e/o nel decorso di una malattia. Nel contesto dei farmaci classici, un bersaglio biologico è solitamente una proteina come un recettore, un enzima, un trasportatore o un canale ionico, che il composto modula per correggere uno squilibrio o per curare una malattia. Gli esempi più comuni di farmaci mirati includono i beta-bloccanti, che inibiscono i recettori beta-adrenergici per ridurre la pressione arteriosa, e gli inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE-inibitori), che riducono i livelli di angiotensina II per trattare l'ipertensione.

L'introduzione delle biotecnologie ha rivoluzionato il modo in cui vengono identificati e sfruttati questi bersagli biologici. In passato, lo sviluppo di farmaci si basava principalmente su uno screening fenotipico. I ricercatori somministravano potenziali farmaci a cellule o organismi interi

e osservavano gli effetti fisiologici, senza necessariamente sapere su quale bersaglio molecolare il farmaco stesse agendo. Questo approccio era altamente empirico e richiedeva un lungo processo di tentativi ed errori per identificare molecole terapeuticamente efficaci. Con l'avvento delle biotecnologie, questo paradigma è cambiato. L'approccio moderno si basa sull'identificazione di bersagli molecolari specifici, il che consente un processo noto come screening on-target. In questo approccio, si parte dall'identificazione di un bersaglio molecolare che è direttamente coinvolto nella patologia, come un recettore mutato o un enzima disfunzionale, e si sviluppano farmaci mirati a quel bersaglio. Questo metodo riduce notevolmente la casualità nel processo di scoperta e consente lo sviluppo di terapie più mirate ed efficaci. Il successo dello screening on-target dipende fortemente dalla capacità di identificare bersagli molecolari validi e di valutare accuratamente l'effetto del farmaco su tali bersagli.

BERSAGLI PROTEICI

Esistono diverse categorie di bersagli biologici che possono essere sfruttati per lo sviluppo di nuovi farmaci:

- *Proteine già target di farmaci esistenti.* Questi bersagli sono già stati identificati e sono utilizzati da farmaci in commercio. Queste proteine sono fondamentali per varie funzioni fisiologiche e patologiche e i farmaci agiscono su di esse per modulare una risposta terapeutica. Per esempio, gli inibitori della proteina chinasi mTOR sono utilizzati per trattare diversi tipi di tumori.
- *Proteine per le quali sono stati sviluppati ligandi.* In questo caso, si conoscono ligandi o inibitori che interagiscono con le proteine target con un'affinità sufficiente per produrre una risposta terapeutica. Il processo di scoperta di farmaci che agiscono su questi bersagli può beneficiare della conoscenza esistente di composti che interagiscono con tali proteine, come gli mAb o piccole molecole inibitrici.
- *Proteine associate a fenotipi patologici.* Questi bersagli sono proteine coinvolte in malattie specifiche, per le quali si stanno sviluppando anticorpi o altre terapie basate sulla modulazione del bersaglio. Un esempio significativo è il recettore HER2, una proteina sovraespressa in alcuni tipi di tumore al seno, bersaglio dell'anticorpo monoclonale trastuzumab.
- *Proteine con sequenza conosciuta ma senza farmaci associati.* Esistono molte proteine la cui sequenza genetica è nota, ma che non sono ancora state completamente esplorate come bersagli terapeutici. Queste proteine rappresentano un vasto serbatoio di opportunità per la ricerca futura, in particolare con l'ausilio di tecnologie di bioinformatica e di analisi in silico.

BERSAGLI GENETICI E MECCANICISTICI

I bersagli biologici possono essere ulteriormente suddivisi in *bersagli genetici* e *bersagli meccanicistici*:

- *Bersagli genetici.* Rappresentano geni la cui alterazione è associata in modo specifico allo sviluppo della malattia. Questi bersagli sono particolarmente rilevanti per le malattie ereditarie monogeniche, in cui una singola mutazione in un gene può causare una malattia. L'analisi genetica avanzata, come il sequenziamento del DNA, ha reso possibile identificare nuovi bersagli genetici, aumentando significativamente le opportunità di sviluppare farmaci personalizzati basati su varianti genetiche specifiche. Tuttavia, le malattie monogeniche sono relativamente rare, il che limita il numero di bersagli genetici che possono essere sfruttati a fini terapeutici.

- *Bersagli meccanicistici.* I bersagli meccanicistici non sono direttamente legati a singole mutazioni, ma sono proteine o enzimi che se alterati portano allo sviluppo di malattie (che spesso sono quelle multifattoriali). Questi bersagli giocano un ruolo nella regolazione di processi biologici cruciali, come l'infiammazione, la crescita cellulare o la risposta immunitaria. Un esempio di bersaglio meccanicistico è rappresentato dagli inibitori della cicloossigenasi (COX), utilizzati come farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) per inibire l'enzima coinvolto nella sintesi delle prostaglandine, mediatori dell'infiammazione. In questo contesto, il bersaglio non è una mutazione genetica, ma un enzima la cui attività è regolata in modo aberrante. Le malattie multifattoriali, come il diabete, le malattie cardiovascolari o i tumori, coinvolgono spesso numerosi bersagli meccanicistici che possono interagire tra loro, rendendo il trattamento più complesso. La regolazione di un singolo bersaglio in questi contesti può non essere sufficiente a curare la malattia, ma può fornire un significativo beneficio terapeutico quando combinata con altre terapie.

Conclusioni

Con l'introduzione delle biotecnologie e delle tecnologie avanzate di sequenziamento e analisi molecolare, i ricercatori hanno ora a disposizione strumenti senza precedenti per identificare e caratterizzare bersagli genetici e meccanicistici associati a una vasta gamma di malattie. Questi progressi stanno portando allo sviluppo di terapie sempre più mirate e personalizzate, capaci di affrontare malattie complesse con un'efficacia e una precisione mai viste prima. Nonostante questi progressi, restano ancora molte sfide da superare nello sviluppo di farmaci efficaci. La farmacocinetica e la farmacodinamica giocano un ruolo fondamentale nell'ottimizzazione del trattamento: come il farmaco viene assorbito, distribuito, metabolizzato e infine eliminato dall'organismo (farmacocinetica) e come interagisce con il bersaglio per produrre l'effetto desiderato (farmacodinamica) sono questioni centrali per determinare l'efficacia e la sicurezza del farmaco stesso. Inoltre, non essendo i bersagli molecolari sempre espressi esclusivamente nei tessuti malati, il farmaco rischia di causare effetti collaterali off-target o immunogenicità che possono ridurre l'efficacia e l'aderenza al trattamento.

La sfida di sviluppare farmaci sicuri ed efficaci richiede una comprensione sempre più approfondita dei meccanismi biologici alla base delle malattie e dell'interazione tra farmaci e bersagli molecolari.

BIBLIOGRAFIA

1. Mullard A. 2023 FDA approvals. *Nat Rev Drug Discov.* 2024;23(2):88-95.
2. Smith B, Carson S, Fu R et al. Drug Class Review: Disease-modifying Drugs for Multiple Sclerosis: Final Update 1 Report [Internet]. Portland (OR): Oregon Health & Science University. 2010.