

Comprende versione

ebook



Maria Luisa Calabrò

Compendio di Biotecnologie Farmaceutiche

II Edizione




EdiSES
EDIZIONI

Accedi ai contenuti digitali

Espandi le tue risorse

un libro che **non pesa**
e si **adatta** alle dimensioni
del **tuo lettore!**



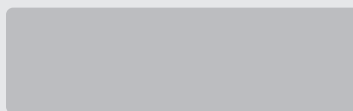
▼
COLLEGATI AL SITO
EDISES.IT

▼
ACCEDI AL
MATERIALE DIDATTICO

▼
SEGUI LE
ISTRUZIONI

Utilizza il codice personale contenuto nel riquadro per registrarti al sito **edises.it** e accedere ai contenuti digitali.

Scopri il tuo **codice personale** grattando delicatamente la superficie



Il volume NON può essere venduto, né restituito, se il codice personale risulta visibile.
L'**accesso ai contenuti digitali** sarà consentito **per 18 mesi**.

Per attivare i **servizi riservati**, collegati al sito **edises.it** e segui queste semplici istruzioni

▼
Se sei registrato al sito

- clicca su *Accedi al materiale didattico*
- inserisci email e password
- inserisci le ultime 4 cifre del codice ISBN, riportato in basso a destra sul retro di copertina
- inserisci il tuo **codice personale** per essere reindirizzato automaticamente all'area riservata

▼
Se non sei già registrato al sito

- clicca su *Accedi al materiale didattico*
- registrati al sito **edises.it**
- attendi l'email di conferma per perfezionare la registrazione
- torna sul sito **edises.it** e segui la procedura già descritta per *utenti registrati*



I contenuti digitali sono accessibili dalla propria **area riservata** secondo la procedura indicata nel frontespizio.

Dalla sezione **materiali e servizi** della tua area riservata potrai accedere all'**Ebook**, ovvero la versione digitale del testo in formato epub, standard dinamico che organizza il flusso di testo in base al dispositivo sul quale viene visualizzato. Fruibile mediante l'applicazione gratuita BookShelf, consente una visualizzazione ottimale su lettori e-reader, tablet, smartphone, iphone, desktop, Android, Apple e Kindle Fire.

L'accesso ai contenuti digitali sarà consentito per **18 mesi**.

Maria Luisa Calabrò

Compendio di Biotecnologie Farmaceutiche

SECONDA EDIZIONE


EdiSES
EDIZIONI

Maria Luisa Calabrò

Compendio di Biotecnologie Farmaceutiche

Copyright © 2026, 2008, EdiSES Edizioni S.r.l. – Napoli

9 8 7 6 5 4 3 2 1 0
2030 2029 2028 2027 2026

Le cifre sulla destra indicano il numero e l'anno dell'ultima ristampa effettuata

*A norma di legge è vietata la riproduzione, anche parziale,
del presente volume o di parte di esso con qualsiasi mezzo.*

L'Editore

*L'Editore ha effettuato quanto in suo potere per richiedere
il permesso di riproduzione del materiale di cui non è tito-
lare del copyright e resta comunque a disposizione di tutti
gli eventuali aventi diritto*

Copertina

Immagine generata con IA e successivamente ottimizzata per la stampa

Progetto grafico e Fotocomposizione:

EdiSES Edizioni S.r.l. – Napoli

Stampato presso la

Vulcanica S.r.l. – Nola (NA)

Per conto della

EdiSES Edizioni S.r.l. – Piazza Dante, 89 – Napoli

www.edises.it

assistenza.edises.it

ISBN 978 88 3623 267 3

I curatori, l'editore e tutti coloro in qualche modo coinvolti nella preparazione o pubblicazione di quest'opera hanno posto il massimo impegno per garantire che le informazioni ivi contenute siano corrette, compatibilmente con le conoscenze disponibili al momento della stampa; essi, tuttavia, non possono essere ritenuti responsabili dei risultati dell'utilizzo di tali informazioni e restano a disposizione per integrare la citazione delle fonti, qualora incompleta o imprecisa.

Realizzare un libro è un'operazione complessa e, nonostante la cura e l'attenzione poste dagli autori e da tutti gli addetti coinvolti nella lavorazione dei testi, l'esperienza ci insegna che è praticamente impossibile pubblicare un volume privo di imprecisioni. Saremo grati ai lettori che vorranno inviarci le loro segnalazioni e/o suggerimenti migliorativi sulla piattaforma assistenza.edises.it

INDICE GENERALE

PARTE PRIMA

LE BIOTECNOLOGIE FARMACEUTICHE: PRINCIPI E TECNICHE DI PRODUZIONE

Introduzione alle biotecnologie innovative	5
--	---

CAPITOLO 1

Fasi di sviluppo dei processi biotecnologici e affermazione delle bioimprese	11
Bibliografia	20

CAPITOLO 2

La tecnologia del DNA ricombinante

■ Sviluppo della tecnologia del DNA ricombinante	21
■ Le endonucleasi di restrizione	23
■ Fasi della tecnologia del rDNA e azione della DNA ligasi	25
■ Vettori per la clonazione del DNA esogeno	28
■ Metodi per il trasferimento genico in procarioti e lievito: trasformazione	46
■ Vettori e metodi per il trasferimento genico in cellule animali: transfezione	49
■ Selezione	60
Bibliografia	68

CAPITOLO 3

Le fonti del DNA bersaglio nelle biotecnologie farmaceutiche

■ Metodo del cDNA	71
■ Sintesi chimica del DNA	74
■ Ibridazione del DNA: ottenimento di DNA artificiale a doppio filamento	79
■ Sonde di DNA	82
■ Microarray a DNA	93
■ La tecnologia della PCR (reazione a catena della polimerasi)	94
Bibliografia	104

CAPITOLO 4

Sequenziamento del DNA

■ Metodo di sequenziamento a degradazione chimica (Maxam e Gilbert)	108
■ Analisi delle famiglie nucleotidiche provenienti dal saggio di sequenziamento mediante gel-elettroforesi	110
■ Metodo di sequenziamento enzimatico (Sanger)	113
Bibliografia	120

CAPITOLO 5

Produzione su ampia scala di proteine ricombinanti: la bioindustria nel settore farmaceutico

■ Sistemi biologici per l'espressione del gene clonato e banche cellulari.....	121
■ Produzione delle proteine in colture cellulari procariote (<i>Escherichia coli</i>).....	124
■ Produzione delle proteine in colture cellulari eucariote.....	132
■ Produzione delle proteine in cellule di lievito (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	132
■ Produzione delle proteine in cellule animali.....	134
■ Biostrumentazioni e lavorazioni a valle nella produzione su ampia scala di proteine ricombinanti.....	136
■ Separazione delle cellule dal mezzo di coltura.....	138
■ Recupero del prodotto.....	140
Bibliografia.....	147

CAPITOLO 6

Tecniche di analisi e purificazione di macromolecole biologiche

■ Cromatografia.....	150
■ Elettroforesi.....	165
■ Modalità operative in elettroforesi capillare.....	178
Bibliografia.....	184

PARTE SECONDA

BIOTECNOLOGIE FARMACEUTICHE: NUOVE FRONTIERE TERAPEUTICHE, PROFILATTICHE E PRODUTTIVE

Panoramica sugli approcci innovativi nella cura della salute.....	189
Bibliografia.....	199

CAPITOLO 7

Ormoni polipeptidici

■ Insulina.....	201
■ Glucagone.....	223
■ Ormone della crescita e analoghi.....	225
■ Pegvisomant.....	233
■ Gonadotropine.....	235

■ Tireotropina.....	243
■ Paratormone e teriparatide.....	244
Bibliografia.....	251

CAPITOLO 8

Citochine

■ Interleuchine.....	261
■ Interleuchine autorizzate e commercializzate.....	264
■ Interleuchina-11.....	268
■ Interleuchine approvate come proteine di fusione.....	269
■ Interleuchina-1 e IL-1 antagonista recettoriale.....	271
■ Interferoni.....	274
■ Interferone- α	279
■ Interferone- β	284
■ Interferone- γ	288
■ Fattori di crescita emopoietici.....	291
■ Fattori di stimolazione delle colonie di granulociti (g-csf) e di granulociti e macrofagi (gm-csf).....	293
■ Eritropoietina.....	299
■ Trombopoietina e agonisti del TPOR.....	305
Bibliografia.....	310

CAPITOLO 9

Proteine del sangue

■ Sistema coagulativo.....	316
■ Fattore VII.....	320
■ Fattore VIII.....	323
■ Fattore IX.....	333
■ Fattore X.....	337
■ Fattore XIII.....	338
■ Antitrombina.....	340
■ Sistema fibrinolitico.....	342
■ Attivatore tissutale del plasminogeno.....	343
■ Sistemi del complemento/di contatto inibitore dell'esterasi C1.....	350
Bibliografia.....	357

CAPITOLO 10

Enzimi con proprietà terapeutiche

■ Desossiribonucleasi I (<i>Dornase alfa</i>).....	361
■ Urato-ossidasi (<i>Rasburicase</i>).....	365
■ Fenilalanina ammonio-liasi (<i>Pegvaliase</i>).....	367

■ L-Asparaginasi (<i>Asparaginasi</i> , <i>Pegaspargasi</i>).....	369
■ Enzimi per la sfingolipidosi.....	372
■ Enzimi per altre malattie lisosomiali.....	380
■ Lipasi acida lisosomiale (<i>Sebelipasi alfa</i>).....	380
Bibliografia.....	386

CAPITOLO 11

Animali transgenici

■ Introduzione alle applicazioni della transgenesi animale in campo farmaceutico.....	389
■ Produzione di animali transgenici.....	393
■ Animali transgenici per la produzione di biofarmaci.....	403
■ Animali transgenici donatori di tessuti e organi nello xenotrapianto.....	407
■ La ricerca nel campo degli xenotrapianti: rischi associati, progressi, risultati.....	410
■ Animali transgenici come modelli di malattie umane nella ricerca biomedica.....	418
Bibliografia.....	426

CAPITOLO 12

Vaccini

■ Introduzione ai vaccini, sviluppo e progressi biotecnologici.....	435
■ Cenni di immunologia – Principi generali.....	440
■ Immunità passiva.....	443
■ Immunità artificiale attiva – i vaccini.....	444
■ Vaccini tradizionali.....	444
■ Limiti dei vaccini tradizionali.....	446
■ Vaccini biotecnologici.....	447
■ Strategie per la produzione di vaccini biotecnologici.....	448
■ Aspetti farmaceutici dei vaccini.....	495
Bibliografia.....	510

CAPITOLO 13

Anticorpi monoclonali

■ Introduzione agli anticorpi e potenzialità terapeutiche.....	515
■ Produzione di anticorpi monoclonali con la tecnologia degli ibridomi.....	522
■ Struttura e funzione degli anticorpi.....	526
■ Anticorpi monoclonali chimerici, umanizzati e umani.....	530
■ Tecniche alternative di produzione di anticorpi e frammenti anticorpali.....	536
■ Anticorpi monoclonali e innovazione: applicazioni nel settore farmaceutico.....	540
■ Anticorpi monoclonali nella terapia del cancro.....	552
■ Anticorpi monoclonali nella terapia immunosoppressiva.....	606
■ Profilassi del rigetto.....	607
■ Altre applicazioni degli anticorpi monoclonali in ambito terapeutico.....	644

CAPITOLO 14

Terapie avanzate

■ Terapia genica.....	699
■ Applicazioni della terapia genica in campo farmaceutico.....	732
■ Terapia cellulare.....	771
■ Ingegneria tissutale.....	781
Bibliografia.....	795

Citochine

Le citochine¹ sono proteine di secrezione con funzione regolatoria, deputata al controllo della sopravvivenza, della crescita e della differenziazione cellulare. Sono tutte glicoproteine e, come mediatori solubili, costituiscono il linguaggio molecolare attraverso cui le cellule del sistema immunitario comunicano tra loro e con altri organi e tessuti, come quello ematico, o nervoso.

Il termine citochina definisce una classe eterogenea di proteine, molte delle quali si producono durante i meccanismi effettori dell'immunità, sia naturale che acquisita. Sono secrete, principalmente, da cellule del sistema immunitario, in risposta a stimoli immunologici, o come segnali di comunicazione intercellulare successivi all'attivazione cellulare. Non vengono prodotte e immagazzinate all'interno dell'organismo, la loro espressione/sintesi è transiente e finemente regolata.

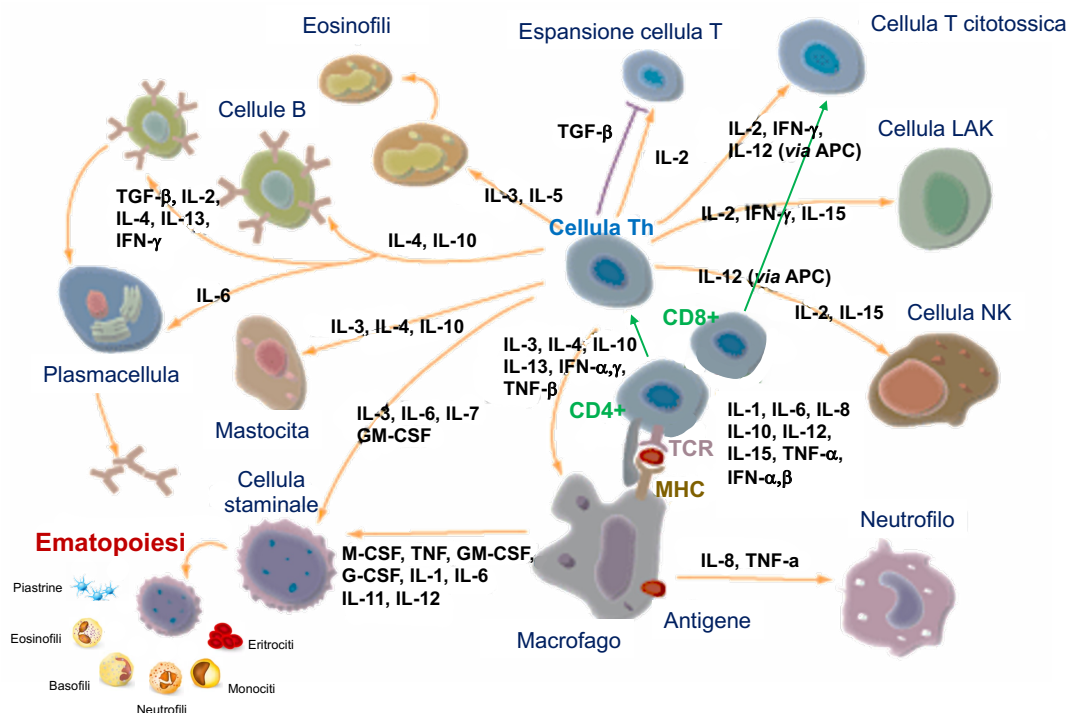
Fu intorno agli anni '70 che si cominciò a delineare il ruolo di queste sostanze, con l'identificazione di molecole che partecipavano alla rete di comunicazioni del sistema immunitario, prodotte da cellule del sistema immunitario, soprattutto dai linfociti T e dai macrofagi, e differenti dagli anticorpi. Molte citochine agiscono mediando la fase effettrice dei

meccanismi aspecifici dell'immunità, o della difesa, controllata dai linfociti T nei confronti di organismi estranei, ma sono coinvolte anche nell'emopoiesi² e nel processo infiammatorio (Fig. 8.1).

Diverse citochine hanno un ruolo di grande importanza nell'immunità naturale, la prima barriera immunologica non specifica, che si mette in moto quando l'antigene invasore attraversa le barriere fisiche e chimiche dell'organismo umano, o animale. L'attivazione cellulare stimola il sistema immunitario e riduce il potere di moltiplicazione/replicazione dell'agente patogeno. In questo tipo di risposta, le citochine possono agire con meccanismi di azione diretta, o indiretta. La produzione di interferone α (IFN- α) e interferone β (IFN- β) da parte dei monociti/macrofagi, nella fase precoce dell'infezione, è un esempio di meccanismo in forma diretta, che induce, nelle cellule a rischio di infezione dal virus, uno stato di resistenza transitoria contro l'infezione di un'ampia gamma di agenti virali. Il rilascio di IFN- α e β dalle cellule infettate non solo riduce la trasmissione del virus alle cellule vicine, ma porta anche all'apoptosi delle cellule infettate, che saranno successivamente rimosse mediante fagocitosi; in tal modo, sia la replicazione del virus che la risposta in-

¹ CITOCHINA: dal greco κύτος «cellula» e κινέω «muovere, mettere in movimento».

² EMOPOIESI: Processo di produzione (formazione e maturazione) delle cellule del sangue, a partire dai loro precursori.



■ **Figura 8.1:** *Network* delle citochine. Le citochine costituiscono una rete complessa di segnali molecolari in grado di attivare diversi tipi cellulari, influenzandone il differenziamento, la proliferazione, la migrazione e la sopravvivenza (effetto anti-apoptotico). Il loro ruolo è fondamentale sia nell'ematopoiesi, processo biologico da cui originano e si sviluppano le cellule del sangue, che nella risposta immunitaria, come illustrato schematicamente. Nella risposta immunitaria, le citochine intervengono sia nella fase innata, più rapida, sia in quella acquisita, più lenta, poiché richiede processi di proliferazione cellulare, riarrangiamento genico e sintesi proteica; in entrambi i casi, l'attivazione della risposta immunitaria comporta la produzione di diverse citochine: alcune hanno un effetto pro-infiammatorio e attraggono specifici tipi cellulari, quali neutrofili o macrofagi, al sito di infezione; altre, come gli interferoni, svolgono un ruolo chiave nel collegamento tra la risposta immunitaria innata e quella acquisita; altre ancora sono attive nei meccanismi di cooperazione tra cellule immunitarie, contribuendo all'attivazione dei linfociti T e B. Quest'ultimo è un processo complesso che richiede, oltre alle citochine, anche la partecipazione di altri effettori, quali le cellule presentanti l'antigene (APC) e l'antigene stesso.

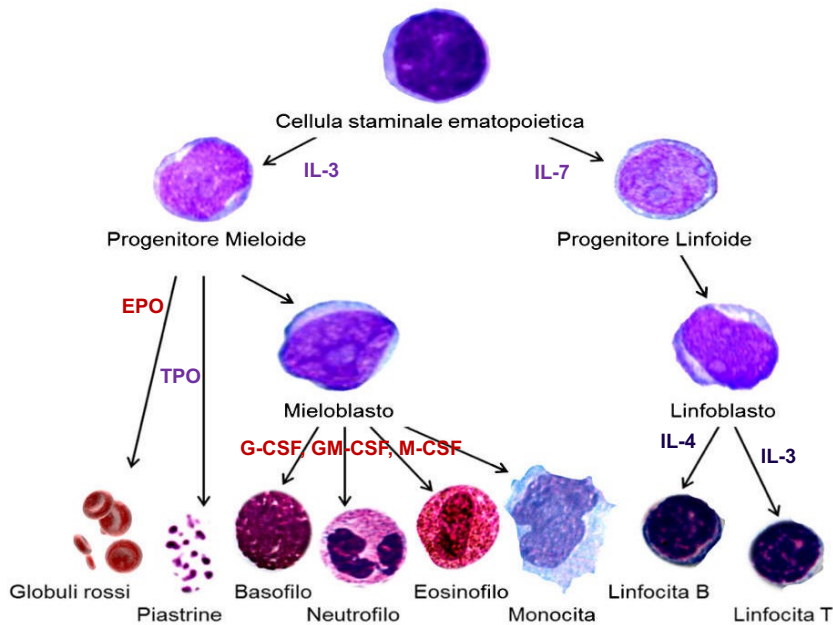
fiammatoria all'infezione risultano limitate. Questo effetto protettivo non ha bisogno di grandi quantità di IFN e costituisce uno dei meccanismi principali nella risposta naturale. Il ruolo fondamentale delle citochine nell'immunità naturale si esplica anche mediante meccanismi immunoregolatori, che portano all'attivazione di cellule NK (*Natural Killer*) e di monociti/macrofagi, responsabili della liberazione di altre citochine, come l'IFN-γ; il meccanismo concertato determina l'uccisione del patogeno fagocitato. Le citochine che agiscono in questa fase sono fondamentalmente prodotte dai monociti/macrofagi e da altre cellule non immuni, come i fibroblasti e le cellule endoteliali.

Citochine come il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF-α), e diverse interleuchine (ILs), quali IL-1, IL-

6, IL-12 e IL-18, agiscono come iniziatori dell'infiammazione, liberando prostaglandine e altri mediatori, inducendo la sintesi di una serie di proteine della fase acuta, come la proteina C reattiva, facilitando l'attivazione dei meccanismi di elevazione della temperatura corporea, inducendo l'espressione di molecole di membrana in grado di mediare l'adesione dei leucociti.

Anche nella risposta immunitaria acquisita le citochine rivestono un ruolo fondamentale. Favoriscono l'attivazione dei linfociti T e B, regolano le principali attività di queste importanti cellule del sistema immunitario e promuovono la differenziazione di effettori citotossici.

Una delle più importanti citochine coinvolte in questi meccanismi è l'IL-2, che permette la proliferazione e la differenziazione dei linfociti T nei due



IL: Interleuchina; EPO: Eritropoietina; TPO: Trombopoietina; G-CSF: Fattore di stimolazione di granulociti; GM-CSF: Fattore di stimolazione di granulociti e macrofagi; M-CSF: fattore di stimolazione di macrofagi.

■ **Figura 8.2:** Principali citochine che stimolano l'ematopoiesi.

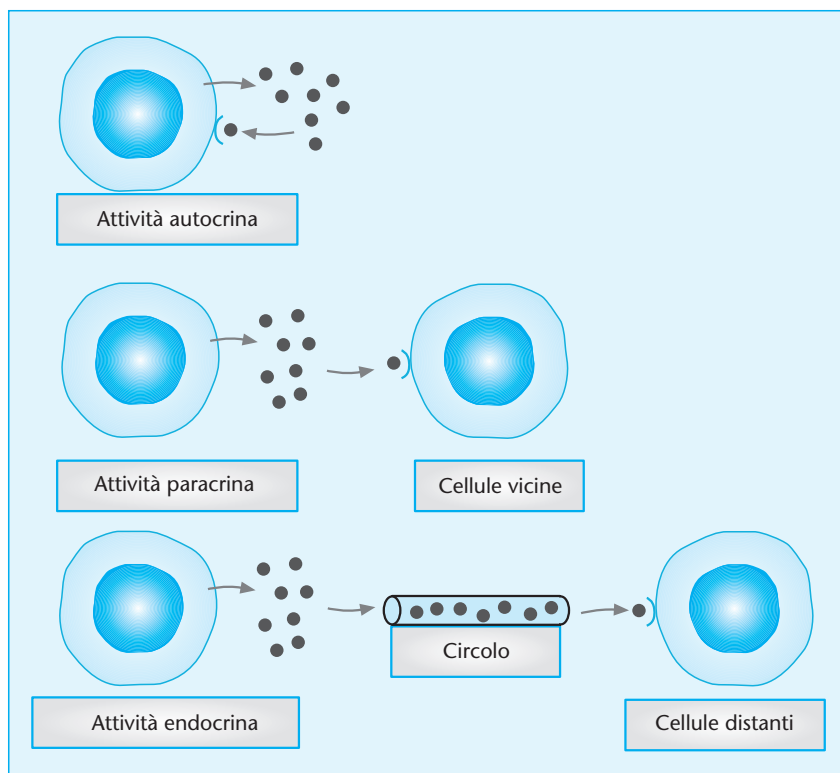
sottotipi cellulari di linfociti T cooperatori CD4³ (T *helper*): i linfociti Th1 (T *helper* 1) e i linfociti Th2 (T *helper* 2), classificati sulla base della funzione *helper*⁴ espletata e delle citochine prodotte. I linfociti Th1 attivano i macrofagi in modo antigene-dipendente e inducono la citotossicità nelle cellule infettate mediante l'attivazione delle cellule NK. I linfociti Th2 forniscono l'aiuto necessario alla funzione effettrice dei linfociti B, favorendone l'attivazione e la differenziazione; inducono inoltre, l'espansione clonale dei linfociti B e la conseguente differenziazione in plasmacellule, produttrici di anticorpi. Anche l'IFN- γ è un influente mediatore dell'immunità acquisita, è un potente attivatore dei macrofagi, dei neutrofili e delle cellule NK e costituisce un importantissimo meccanismo di difesa.

³ Linfociti CD4: I linfociti si classificano in base alla presenza, o meno, di specifici recettori (molecole CD) e alla secrezione di citochine.

⁴ LINFOCITI T *helper*: Cellule che, alla presenza dell'antigene, assistono altri tipi di cellule nella risposta immunitaria. Il meccanismo di assistenza si instaura attraverso la produzione di citochine. Th1: produzione di IL-2, IL-12, INF- γ , TNF (tali citochine attivano i macrofagi in modo antigene-dipendente). Th2: produzione di IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 (tali citochine sono coinvolte nella risposta umorale e allergica).

Un altro gruppo di citochine ha azione stimolante l'emopoiesi. La maggior parte delle cellule del sangue ha vita limitata (ore, giorni) e viene costantemente rinnovata attraverso la produzione di nuovi elementi cellulari. Il processo si svolge principalmente nel midollo osseo, a partire dalle cellule staminali multipotenti (cellule già specifiche di un determinato tessuto), ognuna delle quali può generare tutti gli elementi figurati del sangue; la produzione avviene in quantità diverse per ciascun tipo di elemento, in relazione alle esigenze dell'organismo, ed è regolata da specifiche citochine, note come fattori di crescita emopoietici. A causa dell'enorme sforzo cellulare coinvolto, la risposta immunitaria necessita di un sistema che permetta di reintegrare rapidamente il numero di cellule perdute, per sostituire quelle che degenerano e potere affrontare nuove infezioni. Le citochine responsabili di questo lavoro agiscono fondamentalmente sulle cellule immature, regolando la loro differenziazione, maturazione e proliferazione. Sono molte le citochine che possono realizzare questa funzione, le più importanti sono il fattore di stimolazione delle colonie di granulociti e macrofagi (GM-CSF), di granulociti (G-CSF), l'IL-3, il fattore di stimolazione dei macrofagi (M-CSF), l'eritropoietina (EPO), l'IL-7 (Fig. 8.2). La maggior parte è prodotta dai macrofagi e dalle cellule endoteliali.

■ **Figura 8.3:** Le citochine agiscono, fondamentalmente, in forma locale, sia sulla stessa cellula che le produce (attività autocrina), sia sulle cellule vicine (attività paracrina). In minor proporzione, agiscono su cellule e tessuti distanti dal sito in cui sono prodotte (attività endocrina).



Un'ulteriore rilevante funzione delle citochine è quella di sensore biologico delle condizioni dell'organismo, comprendenti anche il danno tissutale e la presenza di microrganismi estranei, o prodotti da essi derivati. In carenza di ossigeno, ad esempio, le cellule renali producono l'EPO, fattore di crescita che promuove, da parte del midollo osseo, la produzione di eritrociti, la cui funzione vitale è il trasporto dell'ossigeno all'interno dell'organismo.

Come accade per tutti gli ormoni polipeptidici, anche le citochine per espletare le molteplici funzioni si legano a recettori specifici, presenti sulla superficie delle cellule bersaglio. Tali cellule possono essere: le stesse cellule che secernono la citochina (attività **autocrina**: ad esempio, i linfociti T attivati producono IL-2, che promuove la differenziazione di altri linfociti T); cellule situate nelle immediate vicinanze dei loro target (attività **paracrina**: ad esempio, l'attività della IL-2 è principalmente autocrina, ma si può esercitare in maniera paracrina sui precursori dei linfociti T citotossici); cellule distanti dal sito in cui sono prodotte (attività **endocrina**: soprattutto citochine con effetti proinfiammatori, come l'IL-1, agiscono mediante diffusione attraverso il sangue in cellule bersaglio distanti) (**Fig. 8.3**). L'azione delle citochine

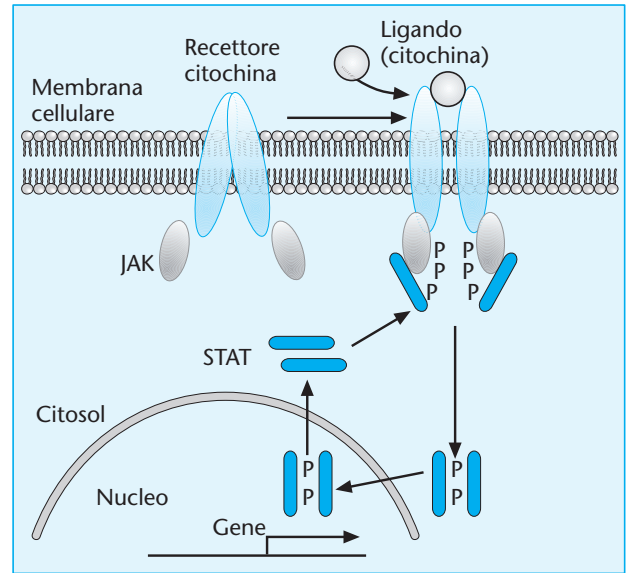
è fondamentalmente a carattere locale (autocrina o paracrina), in minore proporzione endocrina.

È nota la struttura di oltre un centinaio di citochine. La loro secrezione è per lo più un fenomeno transitorio e autolimitato. Sono generalmente prodotte *ex novo* in risposta a stimoli specifici, attraverso la trascrizione di geni specifici, e non vengono mai accumulate nella cellula come molecole preformate.

I recettori per le citochine sono glicoproteine di membrana, la cui espressione è regolata da segnali extracellulari, in genere costituiti dalla stessa citochina o da altre correlate. Sono espressi in numero limitato (da circa 100 a 1000 per cellula, per ciascuna citochina) e, in base all'omologia dei loro domini extracellulari, sono classificati in più famiglie: ciascuna famiglia recettoriale si distingue per specifiche caratteristiche strutturali e, ciascun membro all'interno di una famiglia è una variante proteica con proprietà uniche, capace di indurre risposte funzionali specifiche nella cellula che lo esprime (una descrizione dettagliata della classificazione e delle caratteristiche strutturali dei recettori per le citochine esula dagli obiettivi di questo testo; per approfondimenti si rimanda alla letteratura specialistica).

L'affinità di un recettore per la propria citochina è estremamente elevata, e la regolazione della sua espressione garantisce che solo un insieme specifico di cellule bersaglio possa rispondere a quella determinata citochina. La maggior parte delle risposte cellulari non è immediata, ma richiede neosintesi di mRNA e di proteine.

Il legame di una citochina al proprio recettore (Fig. 8.4) comporta l'attivazione delle JAK-chinasi⁵ e innesca la cascata intracellulare del segnale attraverso una reciproca *cross*-fosforilazione. I residui fosforilati delle JAK attivate determinano il reclutamento di un'altra famiglia di proteine citoplasmatiche, le proteine STAT⁶, che si ancorano mediante il loro dominio SH2⁷ al complesso recettore/JAK e vengono esse stesse fosforilate. La fosforilazione su tirosine da parte delle JAK-chinasi determina la dimerizzazione delle proteine STAT e la loro traslocazione nel nucleo. La conseguenza degli eventi intracellulari successivi al legame della citochina al proprio recettore (nota



■ **Figura 8.4:** I recettori delle citochine sono proteine transmembrana a singolo passaggio, privi di attività catalitica intrinseca, che in seguito al legame con la citochina dimerizzano e attivano la via JAK/STAT, conducendo alla fosforilazione e traslocazione nucleare delle STAT e all'attivazione della trascrizione genica.

⁵ JAK-chinasi: *Janus kinases* (proteine citoplasmatiche ad attività tirosino-chinasica). Sono proteine associate al dominio citoplasmatico di molti recettori per le citochine, cataliticamente inattive fino al legame del ligando al recettore, che ne promuove la dimerizzazione, portando in stretta vicinanza le JAK associate. Le JAK-chinasi giocano un ruolo centrale nel mediare la trasduzione del segnale di molte citochine. Ospitano due potenziali siti attivi, ma è probabile che solo uno di questi sia funzionale. Quando il recettore assume la sua conformazione attiva, i due domini JAK vengono quasi a fronteggiarsi, e a mimare un po' la faccia del Giano bifronte romano, da cui derivano il nome.

⁶ STAT: *Signal Transducer and Activators of Transcription*. Sono proteine distribuite in modo differente nelle varie cellule di diversi tessuti. Come suggerisce il nome, sono parte integrante della trasduzione del segnale; quindi, in grado di far passare il segnale dall'esterno all'interno e, allo stesso tempo, sono responsabili dell'attivazione della trascrizione, poiché sono queste proteine che, agganciatesi al recettore, viaggiano fino al nucleo e consentono la trascrizione di specifici geni citochina-inducibili. Le proteine STAT sono coinvolte nello sviluppo del sistema immunitario e giocano un ruolo essenziale nel mantenere la risposta immunitaria e la sorveglianza dei tumori: l'alterazione o la mancata regolazione della via JAK/STAT può portare a sindromi immunodeficienti, o al cancro.

⁷ DOMINIO SH2: Sono sequenze conservate di circa 100 amminoacidi, importanti per le interazioni proteina-proteina. Ogni dominio SH2 contiene siti distinti per riconoscere e legare la fosfotirosina nel contesto di catene laterali amminoacidiche specifiche.

come *JAK-STAT pathway*) è l'attivazione della trascrizione di specifici geni, sensibili alle citochine, nel nucleo, che mediano la risposta cellulare osservata.

Oltre ai recettori di membrana, sono stati rilevati, nel siero, simili recettori solubili; presenti in quantità cospicua, agiscono come antagonisti dei recettori di membrana, con probabile funzione regolatrice della produzione di citochine.

Pur essendo una famiglia di molecole molto eterogenea, tutte le citochine esibiscono delle proprietà comuni: sono proteine presenti nel mezzo extracellulare e, di norma, non in circolo (a differenza degli ormoni); possono agire su diversificati organi target, determinando una varietà di risposte da organi diversi (pleiotropia); la stessa risposta cellulare può essere mediata da più di una citochina (ridondanza) e possono operare in modo sinergico e cooperativo potenziandosi a vicenda (sinergismo); in altri casi, manifestano effetti diversi sulla stessa cellula bersaglio, ovvero una citochina antagonizza l'effetto dell'altra, dirette entrambe sulla stessa cellula (antagonismo). Pur esibendo un comportamento simil-ormonale, molte delle proprietà che le contraddistinguono non si riscontrano tra gli ormoni classici (Tab. 8.1).

TABELLA 8.1

Proprietà distintive delle citochine e degli ormoni.

PROPRIETÀ	CITOCHINA	ORMONE
Siti produttori	Molti	Cellule specializzate
Bersagli cellulari	Pochi	Molti
Presenza in circolo	No (di norma)	Sì
Inducenti	Insulti esterni	Variazioni fisiologiche
Ruolo biologico	Risposta immunitaria contro l'agente invasore, riparo tissutale	Omeostasi
Pleiotropia	Sì	No
Ridondanza	Sì	No

Generalmente liberati e indirizzati per produrre un effetto localizzato, i componenti di questa classe di glicoproteine influenzano spesso la sintesi di altre citochine, o la loro attività: per molti tipi cellulari agiscono come fattori di crescita, o come regolatori della divisione cellulare; per altri possono invece innescare meccanismi che ne mediano la morte (effetto pro-apoptotico). In molti casi, il tipo di effetto biologico è determinato dalla dose.

Con il termine generico di citochine sono designate tutte le proteine glicosilate a basso PM secrete dalle cellule del sistema immunitario, in particolare dai linfociti T e dai monociti. Tuttavia, anche cellule non appartenenti al sistema immunitario, come i fibroblasti e le cellule endoteliali, possono produrle. In passato, la nomenclatura si basava sull'origine cellulare: si parlava di linfocine quando prodotte dai linfociti, e di monochine quando secrete dai monociti.

Il criterio di classificazione attuale è fondato sulla capacità funzionale, e le raggruppa in un certo numero di sottocategorie, che comprendono interleuchine, interferoni, fattori di crescita emopoietici (fattori di stimolazione delle colonie), chemochine, citochine infiammatorie.

Le *interleuchine* costituiscono un sottogruppo piuttosto eterogeneo di proteine, il cui ruolo è fondamentale nella risposta immunitaria, sia naturale che acquisita. Il termine deriva da "interleucocita" e designa una citochina che favorisce la comunicazione tra i globuli bianchi o, in generale, una sostanza in grado di mediare l'azione dei leucociti. Il termine *interferone* deriva, originariamente, dalla capacità della citochina di interferire con l'infezione virale della cellula e definisce un gruppo di sostanze proteiche, prodotte dalle cellule infettate dai virus, capaci di inibire la multipli-

cazione delle particelle virali al loro interno. A seconda del tipo (IFN- α , β o γ), possono esplicare prevalentemente un'attività antivirale (α , β), antitumorale (α , γ) oppure immunomodulante (β , γ). I *fattori di crescita emopoietici* costituiscono un sottogruppo di citochine prodotte durante il processo infiammatorio e la risposta immune, la cui denominazione origina dall'azione stimolante la produzione di cellule mieloidi, ruolo fondamentale per la crescita e la sopravvivenza delle cellule ematiche. Altre citochine sono designate come *chemochine*, famiglia di piccole proteine proinfiammatorie ad attività chemiotattica, caratterizzata dalla capacità di attrarre cellule di origine diversa verso il sito in cui tali molecole vengono prodotte. Agiscono principalmente come chemioattrattori e attivatori di determinati tipi di leucociti (e.g., IL-8, fattore chemiotattico per i neutrofili).

I recenti progressi delle biotecnologie hanno permesso la produzione di alcuni di questi fattori, in grado di stimolare le difese dell'organismo nei confronti dell'agente infettivo o della proliferazione tumorale, in grandi quantità, rendendo possibile la loro applicazione clinica.

Gli approcci terapeutici basati sulle citochine mirano al trattamento di condizioni patologiche associate ad alterazioni del loro *network*. Tali alterazioni possono manifestarsi in forme opposte: sottoespressione o sovraespressione di una determinata citochina. La sottoespressione può essere corretta con la somministrazione esogena della versione ricombinante della citochina bersaglio: l'approccio è sfruttato, ad esempio, per stimolare la risposta immunitaria nei confronti di cellule maligne, o di patogeni invasori. Al contrario, la sovraespressione patologica può essere trattata con la somministrazione esogena di un antagonista ricombinante specifico, in grado di riequilibrare gli effetti della citochina in eccesso: l'approccio è particolarmente efficace nel contrastare le risposte indotte da elevati livelli di citochine proinfiammatorie (i.e., l'IL-1).

In quanto mediatori chiave nella regolazione della risposta immunitaria, infiammatoria ed ematopoietica, le citochine trovano impiego terapeutico in numerose condizioni, tra cui: patologie autoimmuni, deficit immunitari, neoplasie, infezioni virali, alterazioni ematiche (come neutropenia, o anemia).

Per quanto riguarda la produzione *via* rDNA, pur essendo, tutte, glicoproteine, in molti casi è possibile impiegare sistemi procarioti, dal momento che la glicosilazione non sempre è necessaria per l'espletamento dell'effetto biologico.

Una grave limitazione al loro utilizzo clinico è legata all'elevata tossicità; anche per questo aspetto la produzione biotecnologica offre importanti potenzialità, come l'applicazione di tecniche di manipolazione genetica per lo sviluppo di citochine di seconda generazione, che presentino un miglior rapporto efficacia/tossicità, nonché per il miglioramento delle caratteristiche farmacocinetiche.

Il capitolo fornisce una panoramica delle principali caratteristiche e delle applicazioni terapeutiche di citochine ricombinanti già disponibili commercialmente. Dal 1980 l'EMA e la FDA hanno approvato quasi un centinaio di farmaci a base di citochine, tra cui una ventina classificati come farmaci orfani. Negli ultimi decenni sono state identificate numerose nuove citochine e sono stati compiuti significativi progressi nella comprensione delle funzioni biologiche e del loro ruolo nello sviluppo di molte patologie umane. Tali acquisizioni hanno aperto la strada allo sviluppo e all'approvazione di nuovi farmaci biologici e biosimilari basati sulle citochine, ampliando significativamente le prospettive terapeutiche future.

■ Interleuchine

Le ILs sono un ampio gruppo di citochine prodotte da cellule differenti, quali linfociti, macrofagi, cellule endoteliali vascolari, fibroblasti, cheratinociti; sono coinvolte nei meccanismi di comunicazione fra le cellule del sistema immunitario, fungono da messaggeri solubili tra i leucociti e, mettendoli in condizione di comunicare tra loro, coordinano la risposta immunitaria, così da permettere all'organismo di fronteggiare un'infezione nel modo più efficace possibile. Attraverso la secrezione di queste molecole, un leucocita può guidare l'attività di un altro leucocita. In tal modo, una sola cellula attivata può innescare, in altre, diverse funzioni e regolarne intensità e direzionalità.

Le attività biologiche espletate sono complesse e non del tutto note e includono, oltre al controllo della risposta immunitaria e infiammatoria, la regolazione della crescita e della differenziazione di cellule sane e maligne (primi agenti approvati nella bioterapia del cancro).

Definite interleuchine in virtù del fatto che la maggior parte è prodotta e agisce su leucociti, vengono contrassegnate dalla sigla IL seguita da un numero (progressivo, in ordine di scoperta). Alcune mediano diversi eventi dei processi infiammatori, tra cui la

febbre, altre agiscono da fattori di crescita del sistema emopoietico, ma la capacità di agire da immunostimolanti conferisce, a molte di esse, una potenziale applicabilità nel trattamento di infezioni, immunodeficienza e cancro. Sono state descritte almeno una ventina di ILs differenti, anche se non tutte denominate ufficialmente. La procedura, una volta individuata un'IL originale, consiste nella determinazione della sequenza amminoacidica, allo scopo di identificare il gene codificante, e nella successiva applicazione di tecniche di clonazione per l'ottenimento della quantità necessaria da impiegare nei procedimenti di sviluppo del nuovo farmaco. Molte ILs sono in studio, e costituiscono una promessa delle terapie biologiche, ma poche sono approvate per uso clinico, a causa della mancanza di informazioni complete sulle complesse funzioni biologiche espletate (**Tab. 8.2**). Tra queste, l'**anakinra** (antagonista del recettore dell'IL-1), approvata nel trattamento dell'artrite reumatoide e di malattie correlate; l'**aldesleuchina** (rhIL-2), autorizzata per il trattamento del carcinoma renale metastatico; le proteine di fusione **denileukin diftitox** (rhIL-2-tossina d'eterica tronca) e **tagraxofusp** (rhIL-3-tossina d'eterica tronca) approvate, rispettivamente, per il trattamento del linfoma cutaneo a cellule T e della neoplasia a cellule dendritiche plasmacitoidi blastiche; l'**oprelvekin** (rhIL-11), cofattore emopoietico autorizzato per la prevenzione della trombocitopenia e della deficienza piastrinica. Il trend di sviluppo è in crescita, dal momento che il potenziale terapeutico di diverse altre ILs è in fase di valutazione: IL-4, IL-10 e IL-11 sono state testate per il trattamento dell'artrite reumatoide e della psoriasi, ma i risultati sono stati modesti; è stata anche valutata la somministrazione di una proteina di fusione IL-4-IL-10, in alternativa all'uso delle stesse come proteine singole, ottenendo effetti sinergici; un'altra strategia, in cui l'IL-22 è stata legata a un dominio Fc anticorpale, ha portato a una proteina di fusione in grado di promuovere la riparazione dei tessuti, il cui uso sembra promettente per il trattamento di patologie infiammatorie collegate a insufficienza d'organo, come l'epatite alcolica.

Vari studi clinici hanno evidenziato l'efficacia di diverse ILs come adiuvanti nell'immunoterapia del cancro (vedi **Tab. 8.2**): nel trattamento di tumori solidi, uno studio di fase I ha già rilevato il potenziale adiuvante della rhIL-10 PEGilata; un altro studio di fase I del *National Cancer Institute* sta valutando l'efficacia di una terapia combinata a base di rhIL-12 e

TABELLA 8.2**Interleuchine: fonte cellulare, funzioni biologiche e applicazioni cliniche delle versioni ricombinanti disponibili.**

IL	Fonte cellulare dominante	Principali attività biologiche	Prodotti farmaceutici e Indicazioni terapeutiche
IL-1	macrofagi, linfociti B, cellule NK, fibroblasti	effetto proinfiammatorio sistemico – sintesi proteine di fase acuta, febbre o ipertermia febbrile, rilascio in circolo di leucociti coinvolti nella reazione infiammatoria, induzione attivazione linfociti T, induzione crescita e differenziazione di cellule emopoietiche, aumento metabolismo acido arachidonico e produzione di PGE-2, rilascio di chemochine	
rIL-1 Ra, antagonista recettore IL-1 (anakinra)		inibizione risposta infiammatoria mediata da IL-1	KINERET® Artrite reumatoide, Malattia di Still, Sindromi febbrili periodiche, Febbre mediterranea familiare
rIL-2 (aldesleuchina)	linfociti T	stimolazione linfociti T, stimolazione linfociti B, stimolazione cellule NK	PROLEUKIN® Carcinoma renale metastatico Farmaco orfano Sclerosi laterale amiotrofica
Proteina di fusione rIL-2-tossina difterica (denileukin diftotox)		azione citotossica su linfoma cutaneo cellule T CD25+	ONTAK® Linfoma cutaneo a cellule T
IL-3	linfociti T	fattore di crescita emopoietico – attivazione precursori midollari immaturi	
Proteina di fusione rIL-3-tossina difterica (tagraxofusp)		azione citotossica su cellule che esprimono CD123	ELZONRIS® Neoplasia a cellule dendritiche plasmacitoidi blastiche
IL-4	linfociti Th2	induzione proliferazione linfociti B, fattore di crescita per linfociti Th2	
IL-5	linfociti Th2	induzione proliferazione e attivazione eosinofili, differenziazione linfociti B	
IL-6	linfociti T	differenziazione linfociti B, stimolazione emopoiesi multi-linea, sintesi proteine di fase acuta infiammatoria	
rIL-7	cellule stromatiche	effetti regolatori sulle cellule emopoietiche a livello midollare	Farmaco orfano Leucoencefalopatia multifocale progressiva
Proteina di fusione rIL-7-dominio Fc		incremento livelli linfociti T CD4+	Farmaco orfano Linfocitopenia idiopatica CD4
IL-8	macrofagi	attività chemiotattica per i neutrofili	
IL-9	linfociti T CD4+	effetti regolatori sulle cellule emopoietiche a livello midollare	
IL-10	macrofagi, linfociti T	attività antinfiammatoria per gli effetti di modulazione della risposta immunitaria (attraverso un circuito di feedback negativo regola e impedisce eccessive risposte pro-infiammatorie)	
rIL-10-PEG		attivazione linfociti T CD8+	Farmaco orfano Carcinoma pancreatico
rIL-11 (oprelvekin)	cellule stromatiche	effetti regolatori sulle cellule emopoietiche a livello midollare	NEUMEGA® Azione preventiva nella trombocitopenia e nella deficienza piastrinica chemioterapia-indotta
rIL-12	macrofagi, linfociti B	stimolazione produzione IFN- γ da parte di cellule NK e linfociti T, stimolazione differenziazione linfociti T in linfociti Th1, induzione attività citolitica cellule NK	Farmaco orfano Sindrome acuta da radiazioni
Proteina di fusione IL-12-dominio Fc		attivazione del sistema immunitario nei confronti della neoplasia	Farmaco orfano Glioma

IL-13	linfociti Th2, cellule epiteliali	induzione proliferazione linfociti B
IL-14		induzione proliferazione linfociti B
IL-15	macrofagi e altre cellule tessutali	attivazione e proliferazione cellule NK e linfociti T
IL-16	linfociti T	attività chemiotattica per gli eosinofili
IL-17	linfociti T	attività proinfiammatoria
IL-18	macrofagi	stimolazione produzione IFN- γ da parte di cellule NK e linfociti T (in sinergia con IL-12)
IL-19	monociti, linfociti B	probabile ruolo nell'infiammazione
L-20	monociti, cheratinociti, cellule epiteliali	regolazione differenziazione e proliferazione cheratinociti, fattore mitogeno per i progenitori delle cellule emopoietiche
IL-21	linfociti T CD4+	attivazione, proliferazione, potenziamento attività effettrice linfociti T CD8+, riduzione espressione di IgE
IL-22	cellule dendritiche, linfociti T	iniziatore della risposta immunitaria innata

di un anticorpo monoclonale (pembrolizumab); l'interesse terapeutico nei confronti dell'IL-12 è correlato alla sua capacità di bloccare l'afflusso di sangue alle cellule maligne e di stimolare l'attività killer dei globuli bianchi nei confronti delle cellule tumorali; è stato anche valutato l'uso della stessa rhIL-12 nel trattamento del melanoma e del linfoma cutaneo a cellule T, rilevando una buona attività antineoplastica, ma non disgiunta da effetti tossici collaterali; è stata già osservata l'efficacia clinica della rhIL-15 (che promuove la produzione di linfociti T CD8 citotossici, cellule NK e citochine infiammatorie) nel trattamento di tumori solidi refrattari, ed è stato anche osservato (studi di fase I) che l'uso di rhIL-15 combinato con anticorpi monoclonali (nivolumab, ipilimumab) in grado di bloccare i regolatori negativi fisiologici dell'attività delle cellule T, migliora la risposta immunitaria anticancro, potenziando tutte le risposte dei linfociti T, incluse quelle antitumorali. È stato anche suggerito l'uso della rhIL-7 nella sepsi, per la sua capacità, in pazienti oncologici e linfopenici, di incrementare i livelli dei linfociti T CD8 citotossici e CD4 *helper*.

Il Comitato per i Medicinali per Uso Umano (CHMP, *Committee for Medicinal Products for Human Use*) dell'EMA ha espresso parere positivo per l'approvazione di alcune ILs come **farmaci orfani**, per la diagnosi, la prevenzione e il trattamento di malattie rare. Tra questi, la già citata rhIL-7 (EU/3/12/1013), citochina in grado di stimolare la produzione di cellu-

le T, per il trattamento della leucoencefalopatia multifocale progressiva, malattia degenerativa di origine virale, con l'intento di aiutare il sistema immunitario a debellare il virus; la rhIL-7 fusa con il dominio Fc di un anticorpo umano (EU/3/17/1875) per il trattamento della linfocitopenia idiopatica CD4, in cui la somministrazione della proteina di fusione ha dimostrato la capacità di incrementare i bassi livelli di linfociti T CD4, aiutando così il sistema immunitario a combattere e prevenire l'infezione; la rhIL-10 PEGilata (EU/3/16/1804) come trattamento immunoterapico del carcinoma pancreatico, per la capacità della citochina di attivare i linfociti T CD8, in grado di infiltrarsi nelle cellule tumorali pancreatiche, espletare l'azione citotossica e migliorare così la sopravvivenza; la rhIL-12 (EU/3/16/1727) per il trattamento della sindrome acuta da radiazioni: l'IL-12 ha diverse azioni nell'organismo umano, è una citochina chiave nelle risposte infiammatorie mediate dalle cellule T *helper* di tipo 1, insieme ad altre proteine stimola la produzione di cellule del sangue e ha dimostrato la sua efficacia nel limitare gli effetti delle radiazioni sul midollo osseo (dove vengono prodotte le cellule ematiche) e sull'intestino; è recente, inoltre, l'approvazione di una proteina di fusione, in cui la IL-12 è stata fusa con il frammento COOH-terminale del dominio Fc di una immunoglobulina umana (EU/3/20/2368) per il trattamento del glioma, una neoplasia delle cellule che circondano e supportano le cellule nervose: la strategia di fusione con il frammento anticorpale

consente alla citochina di rimanere attiva più a lungo, per adjuvare il sistema immunitario a combattere la neoplasia. In tabella (**Tab. 8.2**) sono elencate le funzioni biologiche, le applicazioni cliniche e i prodotti farmaceutici delle versioni ricombinanti disponibili a base di ILs.

Interleuchine autorizzate e commercializzate

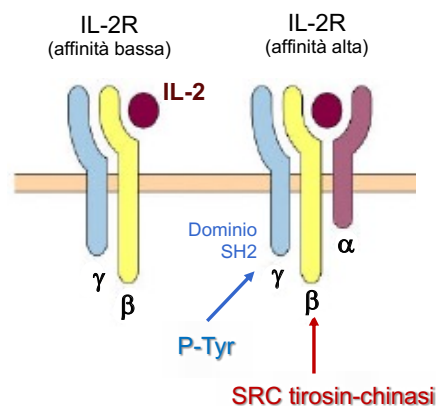
Interleuchina-2

L'IL-2 è il principale fattore di crescita autocrino dei linfociti T. Viene fondamentalmente sintetizzata e secreta dai linfociti T attivati dal contatto con l'antigene, e agisce sulle stesse cellule inducendo l'espressione del proprio recettore, una glicoproteina costituita da tre subunità (α, β, γ) e presente in diverse sottopopolazioni di cellule T (la capacità di agire da fattore di crescita per i linfociti T e da fattore di trascrizione per se stessa innesca un circuito di auto-amplificazione). Sui linfociti T a riposo il recettore è espresso come dimero a bassa affinità (β, γ) e può rispondere solo a concentrazioni molto elevate di IL-2; l'attivazione dei linfociti a opera di un antigene induce la sintesi della catena α , e il recettore trimerico (α, β, γ – che esprime le componenti CD25/CD122/CD132) possiede un'alta affinità per il ligando (**Fig. 8.5**). Dopo aver espresso il recettore trimerico, i linfociti rispondono anche a concentrazioni di IL-2 molto basse.

L'azione di questa citochina è prevalentemente autocrina, ma può esercitarsi in maniera paracrina sui precursori dei linfociti T citotossici (CTL, *Cytotoxic T Cells*): l'occupazione dei recettori da parte del ligando ne determina, infatti, la differenziazione in CTL. Le cellule citotossiche attivate dalla IL-2 prendono il nome di cellule killer attivate dalla linfocina (cellule LAK, *Lymphokine Activated Killer*).

L'IL-2 possiede varie proprietà immunoregolatrici:

- è il principale mediatore capace di stimolare il passaggio dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare dei linfociti T (fattore di crescita dei linfociti T); inoltre, ne stimola la sopravvivenza, inducendo l'espressione di una proteina antiapoptotica;
- alte concentrazioni potenziano l'apoptosi dei linfociti T attivati dall'antigene. La stessa citochina, quindi, da una parte stimola i linfociti T, dall'altra pone fine al prolungamento del processo immune, e in tal modo modula la risposta immunitaria (è



● **Figura 8.5:** Sui linfociti T a riposo, il recettore per IL-2 (IL-2R) è espresso come dimero (β, γ) a bassa affinità; per attivazione antigenica, viene espressa anche la catena α , formando un recettore trimerico (α, β, γ) ad alta affinità per IL-2. La porzione citoplasmatica della subunità β contiene una regione acida, che interagisce con proteine Src, tirosin-chinasi coinvolte nella regolazione di crescita, differenziamento, migrazione e sopravvivenza cellulare, attraverso la fosforilazione di residui di tirosina. La porzione citoplasmatica della subunità γ , invece, presenta un dominio SH2, un modulo di circa 100 residui deputato al legame di specifici motivi peptidici contenenti tirosine fosforilate (P-Tyr), localizzati su altre proteine (o recettori), attivando ulteriori segnali intracellulari.

esemplificativo che topi transgenici *knockout*⁸ per l'IL-2 manifestino malattie autoimmuni e non immunodeficienza);

- induce la proliferazione delle cellule NK e potenzia la loro azione citotossica;
- stimola la proliferazione e l'attività dei linfociti B e quindi la produzione di anticorpi;
- induce una profonda attivazione dell'immunità cellulare: le cellule attivate dall'IL-2 liberano numerose altre citochine, quali l'IFN- γ , il TNF- α , l'IL-1, l'IL-4, il GM-CSF.

L'insieme di questi meccanismi di attivazione, diretti e indiretti, fa sì che la somministrazione *in vivo* di questa citochina produca molteplici effetti immunologici, in maniera dose-dipendente.

Struttura

L'IL-2 umana è una proteina di 133 amminoacidi, con PM di circa 15.6 kDa, glicosilata all'ossigeno della tre-

⁸ **KNOCKOUT GENICO:** Perdita di funzione di un gene per sua delezione, a opera di un transgene omologo modificato (Cfr. sezione dedicata agli Animali transgenici, Cap.11).

Maria Luisa Calabrò

Compendio di Biotecnologie Farmaceutiche

Accedi ai contenuti digitali > Espandi le tue risorse > con un libro che **non pesa** e si **adatta** alle dimensioni del tuo **lettore**



All'interno del volume il **codice personale** e le istruzioni per accedere ai **contenuti digitali**

EdiSES
EDIZIONI

