

LEZIONE 1

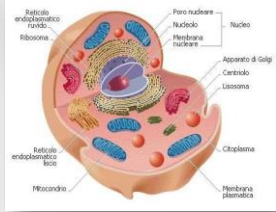
La biochimica applicata è una disciplina che rappresenta un po' il braccio operativo della biochimica generale. Quando parliamo di biochimica applicata, facciamo riferimento ad una disciplina che si occupa di tutta una serie di tecniche, tecnologie e metodologie che si utilizzano nel campo biochimico che hanno consentito nel tempo di acquisire tutte quelle conoscenze che abbiamo oggi nel campo della biochimica. Quindi, in questo corso, dovremmo occuparci principalmente di studiare la preparazione dei campioni biologici e questo è diciamo il topic della biochimica applicata. Lo scopo, però, in questo corso, sarà focalizzarci sull'acquisizione di

Scopo e finalità del corso

BIOCHIMICA APPLICATA: relazione con gli studi preclinici nello sviluppo dei farmaci

acquisire gli strumenti di base

- Ricerca biochimica
- Indagini biochimiche
- Ricerca biomedica



BIOCHIMICA Studio dei processi chimici che avvengono negli organismi viventi. In particolare, comprendere come funzionano le cellule in termini molecolari

- Caratteristiche strutturali, funzionali, cinetiche, termodinamiche delle biomolecole
- Processi anabolici e catabolici
- Aspetti bioenergetici
- Immagazzinamento, replicazione, espressione, riparazione, ricombinazione, controllo dell'informazione genetica e sviluppo della specificità cellulare ...etc etc

Biochimica applicata

biochimica applicata → braccio operativo della biochimica

La biochimica applicata studia i fondamenti teorici, descrive le implementazioni strumentali e insegna le tecniche esecutive delle molteplici attività di laboratorio biomedico. La disciplina studia le tecniche di preparazione dei campioni biologici (tecniche di estrazione, separazione, frazionamento cellulare ecc.) e della loro successiva analisi (con metodi spettroscopici, cromatografici, elettroforetici, immunochimici, biomolecolari ecc.) - pertanto essa spazia dalla biochimica alla chimica, immunochimica, microbiologia, biologia molecolare e fisica.

I principali argomenti trattati, approcciati dal punto di vista pratico, riguardano:

- purificazione e l'isolamento di proteine e di altre biomolecole;
- studio strutturale e funzionale di proteine con l'utilizzo di metodiche chimiche o tecniche fisiche o chimico-fisiche;
- metodiche separative e/o analitiche applicate in campo biochimico (ad esempio, cromatografia, elettroforesi, centrifugazione, spettroscopia, metodi radiochimici);
- applicazioni pratiche di immunochimica;
- studi su colture cellulari;
- purificazione di acidi nucleici ed ingegneria genetica.

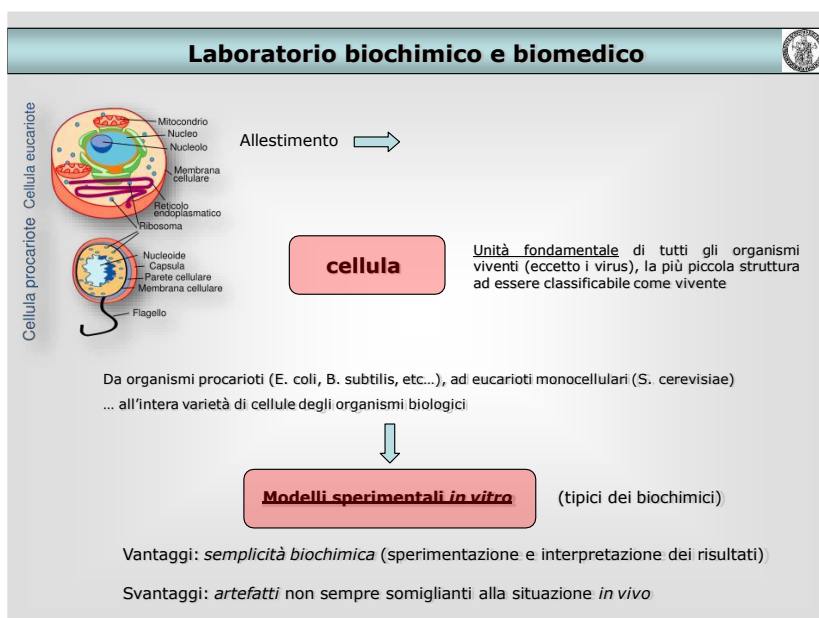
strumenti di base e quindi di imparare a ragionare e saper valutare dati nell'ambito della ricerca biomedica. Una cosa che voglio sottolineare è che gli studi biomedici e biochimici e l'applicazione di tutte le metodiche della biochimica applicata, hanno una relazione molto importante con tutti quelli che sono gli studi che vengono definiti pre-clinici che caratterizzano le varie fasi di sviluppo

di eventuali potenziali farmaci. Quindi ci sono delle correlazioni molto strette e importanti tra le prime fasi di sviluppo di small drug e gli studi di area biomedica/biochimica.

Esistono varie fasi di sviluppo di un farmaco e queste fasi possono essere classificate come fase **zero e fase clinica**. La fase zero viene identificata come la fase pre-clinica e gli studi pre-clinici sono quelli che consentono di portare avanti tutte le tappe preliminari nello sviluppo di un nuovo farmaco. Parliamo quindi di ricerche, di studi estremamente complessi e multidisciplinari e impegnativi in termini sia di risorse umane che di risorse economiche, nonché temporali. Pensate che mediamente si stima che occorranza non meno di 13-15 anni, a volte anche 20 anni, per poter sviluppare nuovi potenziali farmaci. E tutto questo percorso di sviluppo inizia con la fase zero, fase che fa riferimento alla ricerca pre-clinica. Quindi, la ricerca pre-clinica rappresenta la tappa iniziale del percorso del processo di sviluppo di nuovi farmaci ed è suddivisa in vari tipi di valutazioni,, studi, ricerche. In particolare, viene distinta nella pre-clinica in VITRO e nella pre-clinica in VIVO.

Sviluppo pre-clinico di farmaci, di molecole xenobiotiche, e per molecole xenobiotiche indentiamo anche i prodotti nutraceutici. Ma, perché c'è una forte relazione tra gli studi pre-clinici e la ricerca in campo biomedico/biochimico?

Quando iniziamo degli studi sperimentali, è come se, partendo con gli studi di fase zero (da modelli sperimentali più semplici a modelli sperimentali più complessi), noi non abbiamo nessun tipo di informazione della molecola in oggetto di studio e quindi abbiamo bisogno di raccogliere informazioni/nozioni e dati sperimentali che ci consentano di chiarire l'azione biologica di queste sostanze, quindi dobbiamo aprire un vero e proprio **dossier**. Dobbiamo partire realmente da 0 raccogliendo quanti più dati possibili e questi dati li raccogliamo all'inizio dalla ricerca biomedica. Valutiamo in che modo e con quali cellule la sostanza in esame interagisce; che tipo di interazione con le biomolecole la sostanza in esame può dare; che tipo di effetto dà la sostanza in esame con i componenti cellulari. Per questo i primi esperimenti sono di natura biochimica. E come dicevo prima il percorso di sviluppo di un farmaco è un percorso multi-disciplinare e le prime tappe della ricerca sono tutte di natura biomedica e biochimica per iniziare ad intraprendere studi pre-clinici.



La prima tappa della ricerca fa uso di modelli sperimentali classici dei biochimici e sono i modelli cellulari in vitro. Questo ci spiega qual è l'importanza di queste discipline all'inizio del percorso di sviluppo di un farmaco. E così cominciamo ad introdurre i primi tipi di modelli sperimentali.

Possono avere una complessità diversa ma sono tutti complementari all'obiettivo finale e cioè lo sviluppo di potenziali farmaci. Innanzitutto è molto importante saper allestire/preparare questi modelli sperimentali di studio che consentono di portare avanti gli studi correlati allo sviluppo di potenziali farmaci. Ogni fase dello sviluppo è caratterizzata dall'utilizzo di modelli sperimentali specifici. Nella fase pre-clinica i modelli sperimentali più utilizzati sono quelli cellulari che danno vita a modelli sperimentali in vitro, che sono indispensabili per tutta la fase iniziale della ricerca pre-clinica che utilizza esattamente modelli sperimentali in vivo. Infatti, nella ricerca, vengono sia utilizzati i modelli in vitro, che i modelli in vivo grazie all'allestimento di stabulari. I modelli cellulari sono i classici tipi di modelli dei biochimici e questo sottolinea l'importanza di questi studi. Parlare di modelli sperimentali in vitro significa allestire dei modelli sperimentali basati esclusivamente sull'uso di cellule. Una branca della biochimica applicata è la biotecnologia delle colture cellulari che è una disciplina che consente agli sperimentatori di allestire e mantenere in coltura modelli sperimentali basati sull'uso di cellule. Fondamentalmente possiamo disporre e utilizzare tantissimi tipi di modelli in vitro diversi tra di loro. Pensate alla classificazione delle cellule, possiamo usare procarioti, eucarioti, cellule animali o vegetali e quindi possiamo mantenere in coltura in condizioni fisiologiche o fisiopatologiche tutti i tipi di cellule qualsivoglia.

Se stiamo sviluppando delle molecole bioattive le cellule che ci interessano di più sono quelle umane, quindi la nostra attenzione si concentrerà su modelli in vitro di derivazione umana. Se stiamo sviluppando delle molecole che presentano una particolare bioattività su cellule procariotiche è ovvio che il nostro modello sperimentale sarà costituito da cellule batteriche quindi potremmo per esempio testare un antibiotico. Per valutare l'efficacia e l'effetto abbiamo quindi bisogno di una cellula batterica. Tuttavia in ogni caso dovrò utilizzare anche delle cellule umane perchè se noi intendiamo sviluppare un antibiotico rimane indispensabile valutarne l'effetto biologico anche su cellule umane (cellule renali, cellule epatiche, cellule nervose ecc. che rappresentino l'organismo in toto). Più allargo la sperimentazione su modelli cellulari diversi, tanto più ho risultati concreti e dettagliati. Questo è importante, perchè le cellule possono sviluppare effetti **tessuto specifici** e quindi più sperimento su modelli sperimentali differenti tanto più avrò dati a disposizione per completare il dossier iniziale.

Un altro concetto importante: il primo aspetto che si chiede ad un farmaco è quello di non nuocere alle cellule, cioè un farmaco non deve provocare effetti tossici e quindi anche per questo le tappe su colture cellulari sono fondamentali. Questi effetti vengono chiamati **citotossici**. Tenete presente che molecole che presentano citotossicità vengono subito scartate dalla sperimentazione.

Facendo riferimento ai modelli sperimentali in vitro, possiamo già cominciare ad identificare vantaggi e svantaggi. Il vantaggio più importante è la semplicità biochimica del modello stesso. Se stiamo utilizzando delle colture cellulari è chiaro che questo modello è quello più semplice che possiamo usare, diversamente da un modello ex-vivo o in vivo. Questo si traduce nel fatto che la sperimentazione in termini di interpretazione di risultati è più semplice. Quando noi utilizziamo dei modelli in vitro nella maggioranza delle volte questi modelli sono costituiti da un unico tipo cellulare e le risposte che emergono utilizzando questi modelli derivano dal tipo di cellula che stiamo utilizzando. Di contro, lo svantaggio principale è rappresentato dall'insorgenza di artefatti

e di risultati di situazioni che non somigliano alla situazione in vivo. Le risposte in vivo sono molto più complesse e spesso dobbiamo stare attenti a questa situazione per evitare di ottenere dei dati sperimentali che non sono confrontabili con i dati in vivo. Questa situazione viene sempre sanata perchè dopo i modelli in vitro si passa ai modelli in vivo, modelli più complessi (cavie) e quindi tutti i dati ottenuti in vitro dovranno essere poi confermati in vivo. La tappa in vitro è correlata a quella in vivo. Si passa al vivo solo dopo che abbiamo ottenuto dati in vitro che dimostrano assenza di pericolosità, tossicità. Il principio a cui deve sottostare un determinato farmaco è quello di non nuocere le cellule e di non provocare effetti tossici e pericolosi per i sistemi biologici. Quindi noi possiamo progredire nella sperimentazione solo se il farmaco non dimostra effetti tossicologici pericolosi. Passare agli animali impone una serie di autorizzazione che devono essere ottenute dall'ISS e dal Ministero della Salute.

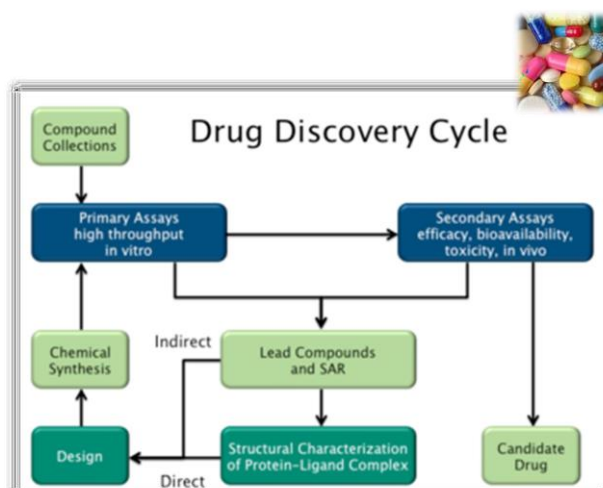
RICERCA PRE-CLINICA



Quando parliamo di studi pre-clinici faremo riferimento solo all'uso di modelli in vitro cellulari allestiti utilizzando qualsiasi tipo di cellule, anche se quelle che ci interessano di più sono quelle umane provenienti dalle banche cellulari. Solo dopo aver completato gli studi pre-clinici e dopo aver iniziato ad acquisire informazioni, si può passare alla fase clinica che è quella che utilizza il modello umano e la fase clinica è quella

conclusiva del percorso di un farmaco prima della sua immissione al commercio. Ovviamente il numero di molecole che arriva in fase clinica è contenuto, ma molte delle molecole in sperimentazione verranno scartate e uno dei motivi principali di scarto sono gli effetti di natura tossicologica.

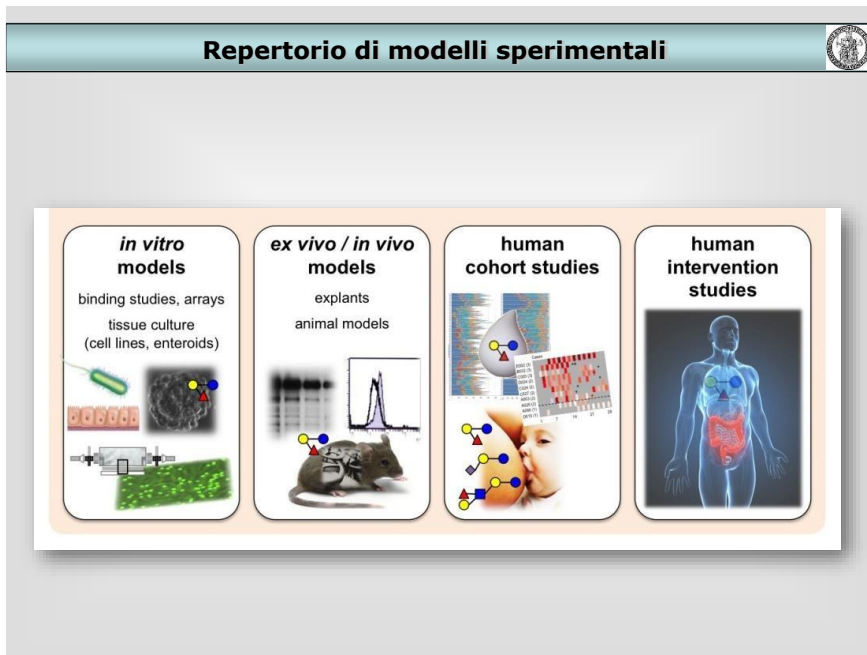
Preclinical «Drug Discovery»



Anche a livello pre-clinico il quadro è molto complesso e si basa sull'allestimento di saggi che consentono di iniziare ad individuare molecole che presentano bioattività. Si parte, in genere, da librerie di composti.

Possiamo avere approcci computazionali, possiamo partire da molecole naturali o semi-sintetiche e quindi modificando chimicamente composti vegetali. Sicuramente uno dei primi tipi di saggi che si esegue è il micro-array e poi si passa a saggi via via più complessi che consentono di valutare efficacia, tossicità, biodisponibilità. Chiaramente questi saggi vengono fatti in vivo. Tutto questo consente di scoprire i leads compound. Le indagini, inoltre, consentono poi di definire sempre più dettagliatamente le interazioni struttura-attività e tramite la chimica farmaceutica si vanno poi a valutare modifiche chimiche in grado magari di migliorare l'attività e la potenza della molecola.

MODELLI SPERIMENTALI



Si parte dai modelli più semplici in vitro per passare a modelli più complessi in vivo o ex vivo. Quando parliamo di modelli in vivo e in vitro stiamo facendo riferimento sempre alla fase zero pre-clinica. Chiaramente si sperimenta prima in vitro e poi in vivo. Con i modelli in vitro possiamo utilizzare qualsiasi tipo di cellula e possiamo studiare l'attività in condizioni sperimentali differenti. Ex-vivo significa

che deriva da una cavia in toto che viene sacrificata e dalla quale vengono prelevati dei reperti biologici che verranno mantenuti in condizioni fisiologiche. Il modello ex vivo si colloca tra quelli in vitro e in vivo. Un altro aspetto è questa definizione "**mantenimento in condizioni fisiologiche**" di cellule, tessuti, organi. Questo perché devo cercare di riprodurre modelli fisiologici per tutta la sperimentazione e per questo esistono protocolli di sperimentazione che mi indicano come mantenere in condizioni fisiologiche queste matrici biologiche. Le condizioni devono essere uguali a quelle che le cellule avrebbero in vivo nell'organismo. Il passo successivo dopo la fase zero è quello di andare in corti umane, piccoli gruppi di persone sulle quali cominciano i trials clinici.

Perché la ricerca pre-clinica?

Perché è molto importante avere tutta una serie di dati biologici relativi all'interazione del farmaco con i modelli biologici prima di andare a studiare il comportamento del farmaco nell'uomo. Quindi è necessario per la **sicurezza**. Se parliamo di sperimentazione pre-clinica abbiamo da stabilire tutta una serie di comportamenti della molecola che stiamo studiando e per fare questo dobbiamo effettuare dei saggi che ci consentono di evidenziare effetti tossici. Il dossier di dati ci serve per arrivare ai clinical trials, dove la molecola in questione non è più "molecola" ma tende a diventare un potenziale farmaco.