

## 1 LEZIONE

È una lezione più che altro introduttiva per fare un po' una panoramica di quello che andremo a studiare e quello che è il principio che sta alla base proprio di questo esame, quindi tecniche di laboratorio biomedico.

- 01 Introduzione
- 02 Biotecnologia delle colture cellulari
- 03 In vitro Bioscreens
- 04 Modelli preclinici avanzati
- 05 Tecniche centrifugative
- 06 Spettrofluorimetria
- 07 Fluorimetria
- 08 Esplorando le proteine
- 09 Elettroforesi

È un overview del programma raggruppato nei vari macroargomenti, poi ogni argomento di questo verrà sviluppato in altri.

Oggi andiamo a vedere la parte introduttiva della sperimentazione e poi della sicurezza in laboratorio.

**01** Introduzione: scopo e finalità

acquisire gli strumenti di base

- Ricerca biochimica
- Indagini biochimiche
- Ricerca biomedica

La **biomedicina** è una branca della scienza medica basata sull'applicazione dei principi delle scienze naturali e della biologia e biochimica alla pratica clinica.

La biomedicina comporta lo studio dei processi patofisiologici con metodi propri di biologia, chimica e fisica. Gli approcci variano dalla semplice comprensione delle interazioni molecolari allo studio delle conseguenze in vivo. Questi processi sono studiati con un occhio di riguardo per l'elaborazione di nuove tecniche diagnostiche e terapeutiche.

**biomedicine**

medical research or treatment that relates to the principles of biology or biochemistry:

- Gene editing has enormous potential across biological science, from biomedicine to food security.
- She is an assistant professor of biomedicine.

Vediamo prima di tutto che cos'è la biomedicina perché parliamo di tecniche di laboratorio biomedico. *Cosa si intende per biomedicina?* La **biomedicina** è una branca della scienza medica basata sull'applicazione di principi di scienze naturali, della biologia e della biochimica alla pratica clinica. Che cosa comporta? Comporta, quindi, lo studio di processi patofisiologici con dei metodi propri

che possono prendere parte a diversi argomenti che possono essere: biologia, chimica e fisica (perché poi vedremo che verrà spaziato un po' per cui non parliamo solo della biochimica, ma anche della biologia, immunologia, chimica). Gli approcci variano dalla comprensione delle interazioni molecolari allo studio e, quindi, poi delle conseguenze in vivo. Quindi dapprima comprendere quello che succede nel piccolo, nella singola cellula in questo caso, per poi avere e studiare quelle che possono essere le conseguenze in vivo e questi processi verranno studiati con un occhio di riguardo per l'elaborazione di queste nuove tecniche diagnostiche e terapeutiche.

Alla fine il tutto sarà per acquisire degli strumenti di base. Che cosa intendiamo per strumenti di base? Parleremo di ricerca biochimica, indagini biochimiche, ma anche ricerca biomedica, quindi per biomedicina quello che intendevamo prima.

La disciplina studia i fondamenti teorici, descrive le implementazioni strumentali e insegna le tecniche esecutive delle molteplici attività di laboratorio biomedico. 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 spazia dalla biochimica alla chimica, immunochimica, microbiologia, biologia molecolare, patologia clinica, citologia e istopatologia e fisica.

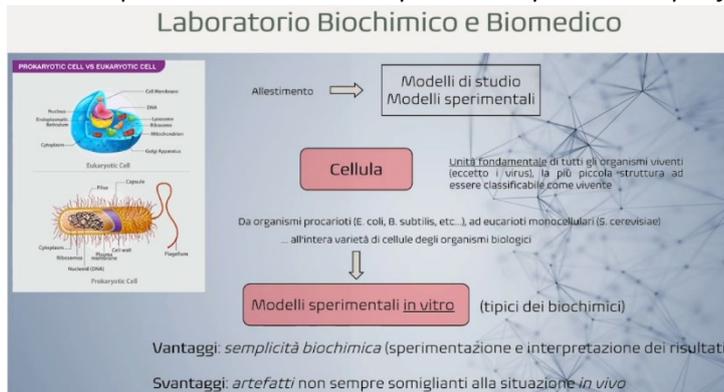
I principali argomenti trattati, approcciati dal punto di vista pratico, riguardano:

- purificazione e isolamento di proteine e di altre biomolecole.
- studio strutturale e funzionale di proteine con l'utilizzo di metodiche chimiche o tecniche fisiche e 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.

*Che cosa studia?* I fondamenti teorici, descrive le implementazioni strumentali e insegna le tecniche esecutive delle molteplici attività di laboratorio. *Che sono queste tecniche?* Tecniche di preparazione dei campioni, tipo tecniche di estrazione, separazione e della loro successiva analisi, quindi mediante metodiche che possono essere separative, analitiche (i metodi

spettroscopici, cromatografici). Per questo motivo spazia non solo dalla biochimica (è vero che ci sono tante nozioni della biochimica), ma anche alla chimica, immunochimica, biologia molecolare, istopatologia e fisica. Gli argomenti che principalmente tratteremo e che possono essere approcciati da un punto di vista pratico riguarderanno: sicuramente studi su colture cellulari, quindi bioscreens in vitro; la coltivazione proprio di linee cellulari (come possono essere, quante linee cellulari ci sono); conosciamo anche lo studio strutturale e funzionale di proteine attraverso l'utilizzo di metodiche chimiche o tecniche fisiche; metodiche separative ad esempio la cromatografia, l'elettroforesi o tecniche di centrifugazione, spettroscopia così come la purificazione di acidi nucleici; applicazioni pratiche di immunochimica (infatti cercherò di darvi delle nozioni soprattutto quando poi parleremo della fluorescenza anche di immunofluorescenza o immunochimica per avere delle nozioni di base).

[Forse faremo delle lezioni pratiche per vedere praticamente qualcosa, tipo colture cellulari, la differenza tra delle linee cellulari o un disco che può essere poco confluyente o molto confluyente, quindi come varia sia macroscopicamente sia microscopicamente per avere e per fissare questi concetti].



Quindi parliamo di cellule, parliamo di modelli sperimentali. Principalmente quello che tratteremo noi è l'allestimento.

[La prima lezione serve proprio ad entrare in confidenza con questi termini, come si dice quando si va a studiare qualcosa].

Che cos'è un modello di studio? In questo caso parliamo di un modello sperimentale.

Quando uno sperimentatore va a mettere a punto questo modello si dice "allestire un modello sperimentale" e nel nostro caso è un

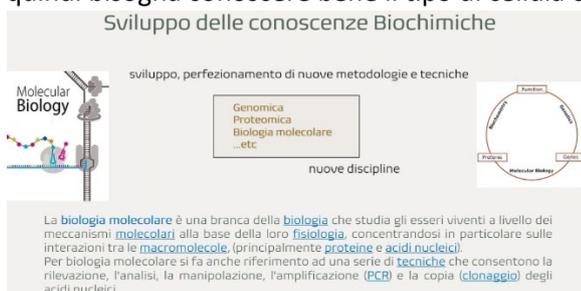
modello sperimentale in vitro (che è proprio tipico dei biochimici o di biologia molecolare). In vitro significa che va ad analizzare quelli che sono gli organismi cellulari che possono spaziare da organismi procarioti a organismi eucarioti. Quello che vedremo principalmente in questo corso saranno quelli eucarioti, quindi le nostre cellule, cellule eucariotiche. Per capire tutto questo, quindi prima di saper come allestire questo modello sperimentale in vitro, bisogna sapere di cosa stiamo parlando, che tipo di cellula dobbiamo allestire, dobbiamo mettere in coltura e dobbiamo capire la differenza o almeno i fondamentali e i principi di base di questa cellula.

I **vantaggi** nell'allestire questi modelli sperimentali in vitro *quali sono?* C'è una semplicità biochimica perché c'è una semplicità nella sperimentazione così come nell'interpretazione del risultato perché andando ad allestire una cellula, rispetto ad un organo o un tessuto o addirittura un organismo in toto (quindi in vivo), ovvio che sarà più semplice la gestione, l'allestimento e poi il comprendere il risultato, a seguito del trattamento del nostro modello sperimentale.

Come **svantaggio**, però, avremo che ci potrebbero essere degli artefatti non sempre somiglianti alla situazione in toto, quindi in vivo (quello che poi andremo a vedere nell'animale o come fine ultimo nell'uomo).

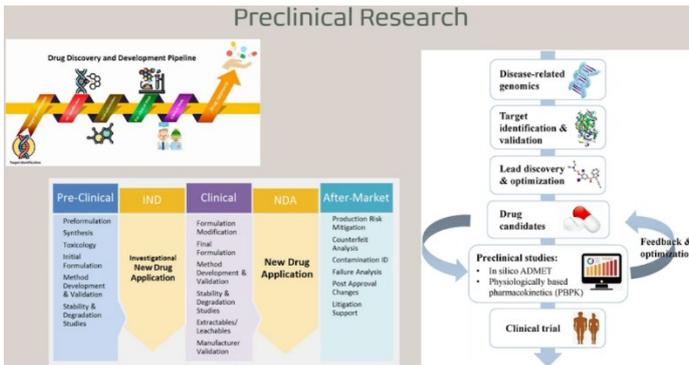
|                                  | Cellula procariote                        | Cellula eucariote  |
|----------------------------------|---|--|
| <b>Organismi tipici</b>          | Batteri ed archeobatteri                  | Protisti, funghi, piante ed animali  |
| <b>Dimensioni tipiche</b>        | ~ 1-10 μm                                 | ~ 10-100 μm (con poche eccezioni, come gli spermatozoi)                                  |
| <b>Tipo di nucleo cellulare</b>  | Nucleoide: nessun nucleo davvero definito | Nucleo racchiuso da doppia membrana  |
| <b>DNA</b>                       | Solitamente circolare                     | Molecole lineari (cromosomi) compresse da istoni   |
| <b>Sintesi di RNA e proteine</b> | Accoppiate nel citoplasma                 | Sintesi dell'RNA nel nucleo e delle proteine nel citoplasma                              |
| <b>Ribosomi</b>                  | 50S+30S                                   | 60S+40S  |
| <b>Strutture citoplasmatiche</b> | Poche strutture                           | Numerose strutture racchiuse da membrane e citoscheletro                                 |
| <b>Movimento cellulare</b>       | Flagelli composti di flagellina           | Flagelli e ciglia composte di tubulina   |
| <b>Mitocondri</b>                | Nessuno                                   | Da uno a diverse migliaia (con alcune eccezioni)   |
| <b>Cloroplasti</b>               | Nessuno                                   | Nelle alghe e nelle piante   |
| <b>Parete cellulare</b>          | Presente                                  | Presente nelle piante  |
| <b>Organizzazione</b>            | Solitamente unicellulare                  | Unicellulare, a colonie e in organismi pluricellulari (contenenti cellule specializzate) |
| <b>Divisione cellulare</b>       | Fissione binaria                          | Mitosi (fissione o gemmazione) e meiosi  |

Qui ha riportato i principali tipi di cellule. Quando parliamo di **distinzione tra cellula eucariotica e procariotica** è importante sapere di cosa stiamo parlando, quindi della cellula eucariotica le principali caratteristiche e differenze anche con quelle procariotiche. Parliamo di presenza di nucleo, del DNA come è fatto e dove si può trovare, quindi anche la presenza del DNA mitocondriale, il tipo di divisione cellulare (questo è importante perché magari molti farmaci o composti possono andare ad interagire e interferire con la divisione cellulare così come altri pathway) e quindi bisogna conoscere bene il tipo di cellula che poi si deve studiare.



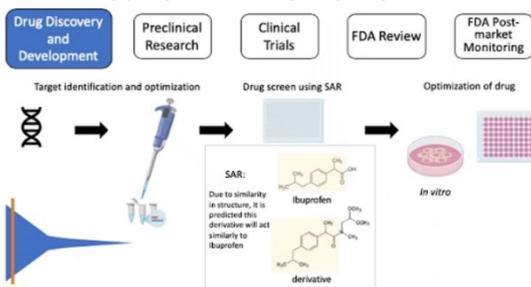
L'ha riportato per meglio comprendere cos'è **la biologia molecolare**: è una branca della biologia che studia gli esseri viventi a livello dei meccanismi molecolari, quindi i meccanismi che sono alla base della loro fisiologia andandoci a concentrare, in particolare, sulle interazioni tra le varie macromolecole. Per macromolecole intendiamo principalmente le proteine e gli acidi nucleici. Si fa riferimento ad una serie di tecniche e queste

tecniche ci consentiranno la rilevazione, l'analisi, la manipolazione, l'amplificazione attraverso una metodica che si chiama PCR, e la copia (tipo con il clonaggio) degli acidi nucleici. Quindi, differenza tra proteomica o genomica e biologia molecolare. Che cos'è la genomica o proteomica? La genomica studia il genoma degli organismi viventi, invece la proteomica le proteine strutturali e funzionali dei vari organismi.



Allora vediamo ora *la ricerca preclinica* perché lo scopo di questo di questo corso è proprio avere delle nozioni o conoscenze di quella che è la ricerca preclinica e clinica, quindi lo sviluppo di un farmaco e, quindi, il drug discovery. È essenziale sapere qual è questo questo drug discovery, che linea può seguire e, quindi, lo sviluppo di un farmaco. Parliamo di farmaco perché nel nostro caso è più specifico, è più vicino a noi, ma per lo

sviluppo di un composto in generale che possa essere magari un composto nell'ambito della cosmetologia così come nella nutraceutica, comunque va a seguire sempre gli stessi passaggi. **Partiamo principalmente da uno sviluppo preclinico per poi passare allo sviluppo clinico e quello di post-market.**

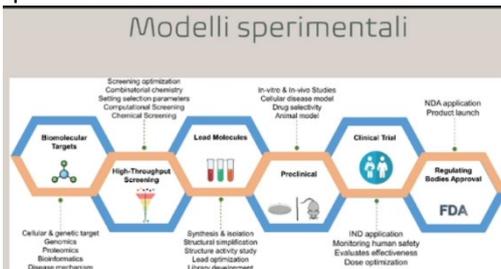


Qui potete vedere nello specifico, nel dettaglio cosa intendiamo per ricerca preclinica, quindi andare ad identificare e ottimizzare quello che è il target verso il quale volete agire, magari andandolo ad inibire o andandolo a stimolare per avere una risposta desiderata.

Prima di tutto bisogna capire e conoscere questo tipo di target per poi, durante la ricerca preclinica, andare a sviluppare una serie di molecole (ma per una serie intendo innumerevoli molecole) per poi arrivare, mediante diversi saggi, allo sviluppo clinico. Lo sviluppo clinico tra preclinico e clinico è una sorta di imbuto, quindi da tanti composti 1-2 andranno in fase clinica per poi essere testati sull'uomo. Per *sviluppo preclinico* intendiamo lo sviluppo di un composto, quindi testare un composto in vitro su linee cellulari e in vivo, quindi sugli organismi in toto. *Sviluppo clinico*, invece, quando parliamo di sviluppare e testare un farmaco sull'uomo e poi la fase di post-marketing che è quella di monitoraggio.

Qui fa riferimento tipo all'ibuprofene, è stato sviluppato questo tipo di struttura proprio perché, conoscendo il target verso il quale si vuole agire, si va a ricostruire, a sintetizzare una struttura che possa essere complementare al target o che possa essere in grado di legare quel target e magari inibirlo, in questo caso.

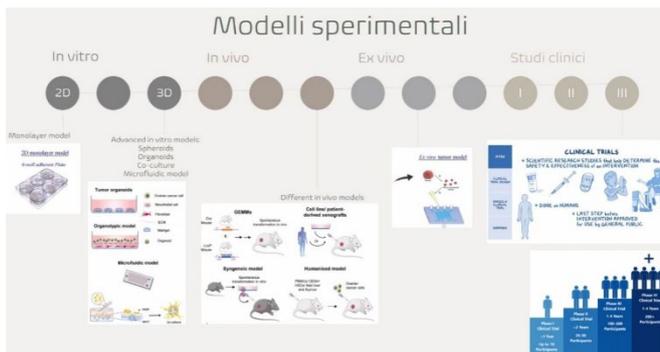
Qui fa riferimento tipo all'ibuprofene, è stato sviluppato questo tipo di struttura proprio perché, conoscendo il target verso il quale si vuole agire, si va a ricostruire, a sintetizzare una struttura che possa essere complementare al target o che possa essere in grado di legare quel target e magari inibirlo, in questo caso.



Abbiamo diversi *modelli sperimentali*: abbiamo detto prima target biomolecolari, quindi capire il target. Prima di tutto bisogna avere conoscenza della letteratura; conoscenza, nel caso in cui stiamo parlando di una patologia, di quella precisa patologia; magari se parliamo di un tumore preciso bisogna partire dal tipo di tumore, capirne le caratteristiche e capire i vari target biomolecolari che possono essere utilizzati e presi in considerazione per poter essere bloccati magari da eventuali

farmaci e, quindi, avere un blocco o una diminuzione di quel cancro, di quel tumore. Poi c'è uno screening ad alta risoluzione, quindi ottimizzare tutta una serie di tanti composti per poi arrivare a uno o due composti (l'imbuto di cui parlavamo prima) per poi avere, quindi, questi lead compound o lead molecole che sono quelle che poi andranno ad essere testate sia a livello preclinico e poi a livello clinico.

Preclinico è quello che vedremo più nel dettaglio, quindi sia in vitro che in studi in vivo per la selettività di un farmaco, modelli animali, quindi diversi sono i modelli sperimentali che possono essere allestiti prima di tutto in base al tipo di patologia o condizione che bisogna e che si vuole studiare e poi in base al tipo di screening che si vuole affrontare.

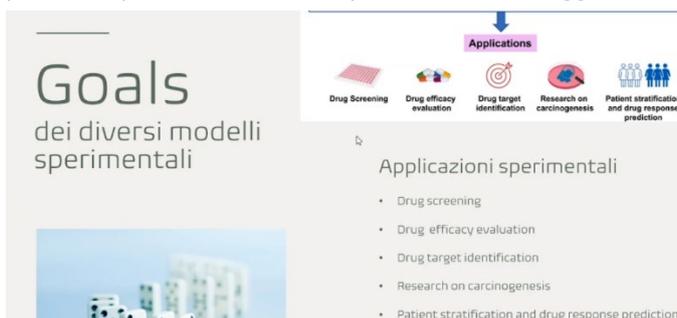


Qui ha dato una panoramica un po' più nello specifico dei modelli in vitro e in vivo che andremo a vedere (perché per quanto riguarda gli studi clinici non andremo a studiare le varie fasi nel dettaglio o almeno come modelli). Più che altro vedremo in vitro: *in vitro* possono essere distinti in modelli 2D, che si chiamano anche monolayer, o modelli 3D che si definiscono anche modelli avanzati in vitro. Poi ci sono i modelli *in vivo*, i modelli *ex vivo* e poi gli *studi clinici*. I modelli

in vitro e i modelli in vivo devono coesistere tra loro, nel senso che sono importanti sia l'uno che l'altro (non è uno meno importante dell'altro). La sperimentazione in vivo deve essere ben studiata in quanto è ancor di più regolamentata da istituzioni proprio per il benessere degli animali che vanno a regolamentare questo tipo di sperimentazione, cosa che in vitro è meno accurata. Quindi, si parte dal vitro e possiamo avere questi modelli monolayer, significa che in una semplice piastra di Petri o multiwell viene seminata e coltivata una linea cellulare (che può essere una linea normale, una linea tumorale) e portata avanti in coltura. Su questa multiwell si effettuano poi diversi tipi di trattamenti, ma il trattamento per quella linea cellulare sarà limitato alla sola risposta di quella linea perché non c'è nient'altro, non ci sono interazioni il contorno che, invece, potremmo trovare in una situazione in vivo che può essere un coinvolgimento del sistema immunitario, così come formazione di neoangiogenesi se parliamo di tumori o capacità di migrazione magari coinvolta o stimolata da altre cellule. Cosa che invece riusciamo di più a studiare mediante l'allestimento di questi modelli avanzati in vitro. Di questi modelli avanzati in vitro noi vedremo più nel dettaglio sferoidi e organoidi. I sistemi di co-coltura sono molto semplici anche nell'allestimento (l'hanno fatto in laboratorio e si tratta semplicemente di mettere in co-coltura, proprio come dice il termine, due o più linee cellulari quindi non si scelgono delle linee cellulari a caso, ma in base allo studio dalla letteratura e si andranno poi ad allestire e a co-coltivare le cellule che potrebbero interagire tra loro mediante rilascio o sintesi di fattori, che possono essere chemiotattici o tipi di interleuchine che possono andare ad interagire e comunicare tra le due linee cellulari, e quindi capire poi questo tipo di interazione come possa tradursi in un effetto di un farmaco).

*[Organoidi e sferoidi lo vedremo nel dettaglio, verranno fatti 2 seminari per meglio comprendere il tipo di modello e come possono essere creati. Poi la stessa cosa, verrà studiato nel dettaglio in vivo, quindi i vari modelli in vivo, ma pressoché studieremo quelli relativi all'allestimento o lo sviluppo di un tumore perché è principalmente quello che studiamo].*

Vedete che tra in vivo e studi clinici, quindi tra preclinico e clinico, c'è questo *ex vivo*. *Ex vivo* prende parte dello sviluppo preclinico e comprende tutte quelle metodiche che vanno ad analizzare quello che deriva dal vivo. *Cosa significa deriva dal vivo?* può essere magari un organo che è stato esportato dal topo (che è stato opportunamente trattato in un certo modo oppure un'alimentazione particolare), così come può essere magari l'asportazione di un tumore, quindi se voglio studiare l'effetto antitumorale di un composto posso poi, alla fine del trattamento, esportare il tumore (quindi all'inizio e alla fine del trattamento) oppure confrontandolo con un topo di controllo e cercare di capire se il mio farmaco ha fatto effetto. Poi ci sono gli studi clinici che si distinguono, quando parliamo poi degli studi sull'uomo parliamo di studi di fase 1, 2, 3 e poi c'è in più la fase 4 che è quella di monitoraggio.



Tutto questo ha delle *applicazioni sperimentali*. *A cosa serve?* Per lo sviluppo di un farmaco, per la valutazione/lo studio dell'efficacia di un farmaco, così come identificare diversi target che quel farmaco può avere, ricerca su carcinogenesi, cancro, quindi studi di composti che possono avere degli effetti-azioni antitumorali oppure dose-risposta a livello di prediction (quindi fare una predizione della dose-risposta).

## ...per lo sviluppo

Dal laboratorio alla farmacia...  
 Costo medio 500-800 milioni di dollari (2010)  
 Tempo medio di sviluppo: 12-16 anni  
 Su circa 10<sup>4</sup> molecole "screenate", solo 5 arrivano alla sperimentazione clinica e di queste una (forse) arriva sul mercato.



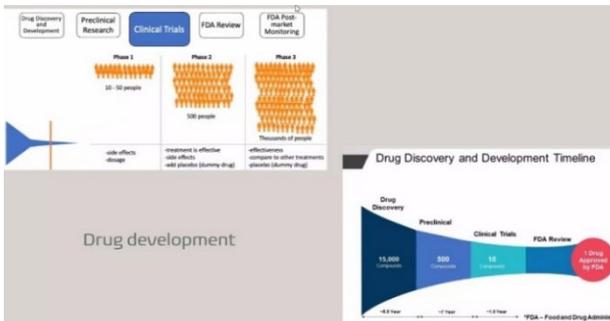
Ricerca pre-clinica



Prima di poter sperimentare sugli esseri umani un nuovo farmaco è necessario dimostrare la "safety" (cioè la non tossicità e la tollerabilità) della molecola (vale il principio di precauzione)

Questo si ottiene da esperimenti di laboratorio *in vitro* ed *in vivo*

forza arrivare a dare una risposta positiva o un farmaco che sia attivo. Quindi, prima di poter sperimentare sugli esseri umani ovviamente è necessario che di questo nuovo farmaco, di questo nuovo composto potenzialmente farmaco, venga dimostrata la safety, quindi sicurezza, non tossicità e tollerabilità di questa molecola e questo lo si ottiene mediante esperimenti sia *in vitro* che *in vivo*.



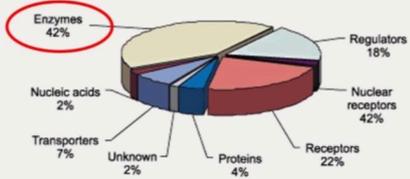
Tutto questo ovviamente ha un costo ed è abbastanza alto e anche un tempo ⇒ per quanto riguarda il tempo medio di sviluppo parliamo di 12-16 anni, delle volte anche 20 anni). Abbiamo tante molecole screenate, qui parliamo di 10.000 molecole screenate, di cui solo 5 arrivano alla sperimentazione clinica e di queste 1 **FORSE** arriva sul mercato. "Forse" perché con tutti gli studi che sono stati fatti poi lo studio può non andare a buon fine. Lo studio può non andare a buon fine perché non è detto che quando si comincia lo studio di un farmaco debba per

Questo è un po' quello che abbiamo detto prima: quindi ci sono diverse fasi per lo sviluppo del farmaco, ricerca preclinica e quella clinica. Nella fase 1 parliamo di poche persone, poi ci sono la fase 2, la fase 3 e poi c'è quella di post-marketing che è quella di monitoraggio che poi durerà per tutta la vita che è quella di fase 4.



Questa è un'indagine statistica, tra tutti i composti o farmaci presenti in commercio o nei vari studi, il 42% di questi sono enzimi, o meglio: i target molecolari dei composti sono degli enzimi, come per esempio l'ibuprofene che va a inibire l'enzima COX responsabile delle prostaglandine che sono i principali mediatori

### Target molecolari



dell'infiammazione. Ovviamente altri target molecolari possono essere altri tipi di recettori, proteine, trasportatori, acidi nucleici etc. Ovviamente questi composti che seguono questa fase di sperimentazione possono essere nell'ambito della cosmetologia così come nell'ambito delle big Pharma.

### Sviluppo dei farmaci e sperimentazione biochimica

Metodi principali di scoperta di nuovi farmaci

- analoghi strutturali di farmaci naturali
- screening ad alta produttività di librerie di composti
- disegno di farmaci su base razionale (modellistica computazionale di strutture tridimensionali)
- bersagli innovativi

Strumenti della ricerca pre-clinica

- elaborazione delle informazioni sperimentali
- scoperta di nuovi composti leader
- sviluppo chimico ed analitico
- caratterizzazione biochimica e biologico-molecolare (esperimenti *in vitro*)
- caratterizzazione farmacologica-tossicologica (*in vivo*, modelli animali)

Sviluppo di nuovi bersagli farmacologici

- basato su funzioni cellulari note di ordine biochimico
- basato sull'analisi e l'interazione con il genoma

La farmacogenomica è una branca della **biologia molecolare** che si occupa di indagare sugli effetti di un determinato **farmaco** in base al **genotipo** dell'individuo. Questo tipo di ricerca non si basa sullo studio dei singoli geni, bensì sul **polimorfismo a singolo nucleotide (SNP = Single Nucleotide polymorphism)**. Sulla base di osservazioni su vari pazienti, si è notato che ognuno reagisce in modo diverso a un determinato farmaco, in base ai polimorfismi di SNP presenti nel suo **aplotipo**. Si può dunque cercare di produrre una "carta d'identità" dell'individuo per SNP, che consente di ridurre notevolmente i tempi di sperimentazione di un farmaco e ottimizzarne l'utilizzo.

disegno di farmaci su base razionale, quindi attraverso modellistica computazionale oppure dei bersagli innovativi. Gli strumenti della ricerca preclinica sono l'elaborazione delle informazioni sperimentali, scoperta di nuovi composti leader, caratterizzazione biochimica e biologica molecolare (quindi attraverso esperimenti *in vitro*), caratterizzazione farmacologica-tossicologica esperimenti *in vivo* (quindi attraverso dei modelli animali). La **farmacogenomica** è una branca della biologia molecolare che si occupa di indagare gli effetti di un determinato farmaco in base al **genotipo dell'individuo**, perché ovviamente ogni farmaco può avere un effetto diverso rispetto ai diversi individui in quanto la risposta può variare in base al genotipo

Qui ci sono diversi metodi principali di scoperte di nuovi farmaci: vi lascio questa slide giusto per avere delle nozioni più che altro scritte per capire da cosa si deve partire: partiamo per avere una scoperta di nuovi farmaci. Possiamo partire da degli analoghi strutturali dei farmaci naturali, quindi se già un c'è un composto di origine naturale si va poi a sintetizzare e sviluppare dei farmaci che hanno la stessa struttura o una struttura analoga a quello naturale. Inoltre un