

**PROGETTO TECNOPRIMI
RAPPORTO TECNICO FINALE**

TECNOLOGIE DI INTERESSE GENERALE

NUOVE TECNOLOGIE PER LA VITA

(a cura di Celestino Spalla)

31 LUGLIO 2008

INDICE

SINTESI E CONCLUSIONI

PARTE PRIMA QUADRO DI RIFERIMENTO

1. Le biotecnologie: definizione e peculiarità	7
2. I settori applicativi	7
2.1 Cura della salute	7
2.2 Chimica ed energia	11
2.3 Protezione dell'ambiente	12
3. La bioindustria	12
3.1 Tipologie di impresa	13
3.2 Il finanziamento della bioimpresa	14
3.3 I fattori di successo	14
4. I driver dello sviluppo biotecnologico	15

PARTE SECONDA LE PRINCIPALI TECNOLOGIE DELLA VITA (BIOTECNOLOGIE)

5. Criteri di identificazione delle filiere biotecnologiche di interesse generale	17
6. Le filiere biotecnologiche di interesse generale	18
6.1 Tecnologie per la ricerca di nuovi farmaci e terapie personalizzate	18
6.2 Nuove tecnologie terapeutiche	26
6.3 Medicina preventiva	31
6.4 Processi produttivi biotecnologici	35

SINTESI E CONCLUSIONI

Lo straordinario sviluppo delle scienze biologiche, che si è verificato nella seconda metà del secolo con la scoperta del codice genetico e della possibilità di analizzarne le funzioni e di agire su di esso in modo predeterminato, ha cambiato profondamente il modello di sviluppo e di innovazione nei settori produttivi a elevato contenuto biologico, come quelli della cura della salute, l'agroalimentare e la protezione dell'ambiente. Le biotecnologie, che da questo sviluppo sono derivate, hanno ridotto in modo drammatico il contenuto di casualità e di conseguente empirismo nei processi di innovazione in questi settori, sostituendoli con un elevato livello di progettualità e di razionalità. Ne è conseguito un salto di qualità nell'efficienza dell'innovazione volta alla identificazione e sviluppo di nuovi farmaci o tecniche terapeutiche, di migliorati processi produttivi a base biologica, di nuove varietà o razze di piante e animali, di nuove metodologie di monitoraggio e controllo della qualità dei prodotti. Tutto questo, se ha portato a un generale aumento di efficienza, ha anche introdotto nel sistema un importante fattore di competizione basato sulla capacità di generare e utilizzare la "conoscenza". Lo scopo di questo lavoro è quello di riferire sullo stato attuale dello sviluppo delle biotecnologie a livello globale; di identificare i driver di questo sviluppo per quanto riguarda sia i bisogni sia le tecnologie capaci di soddisfarli; di valutare in termini sia quantitativi sia qualitativi le potenzialità di sviluppo applicativo delle biotecnologie; di valutare le caratteristiche e potenzialità del sistema scientifico milanese nel settore; di proporre due temi di approfondimento di specifico interesse milanese.

Il documento è articolato in quattro parti

Nella **prima parte** si disegna il quadro di riferimento, si definisce il campo di analisi e si descrivono i progressi applicativi delle tecnologie per la vita. Il settore principale di applicazione delle biotecnologie è quello della cura della salute, per il quale sono stati approvati e commercializzati circa 200 nuovi prodotti per uso terapeutico o profilattico, oltre a parecchie centinaia di prodotti diagnostici, per un fatturato dell'ordine di 80 miliardi \$/anno. Contributi minori, ma tuttavia importanti, si sono avuti anche nei settori agroalimentare e della protezione ambientale. Lo sviluppo delle nuove tecnologie per la vita ha generato nuove forme di imprenditorialità basate sulla conoscenza che si traducono in più di 4000 nuove imprese, la maggior parte delle quali dedite alla ricerca.

Nella **seconda parte** si descrivono le principali tecnologie per la vita, le loro applicazioni e prospettive di sviluppo a breve e medio termine e i dati economici di riferimento. Sono descritte, in particolare:

- l'insieme delle tecnologie cosiddette abilitanti, applicate allo scopo di rendere più efficiente la piattaforma per la ricerca e lo sviluppo di nuovi farmaci (genomica, proteomica, modelli, bioinformatica, *high-throughput screening*, *drug delivery systems* comprese le nanotecnologie);
- le nuove tecnologie terapeutiche (interferenza dell'RNA e cellule staminali);
- le innovazioni nella medicina preventiva (vaccini, diagnostica molecolare e immunodiagnostica);
- i nuovi processi produttivi biotecnologici (produzione di proteine terapeutiche, di anticorpi monoclonali, fermentazione, DNA ricombinante).

L'insieme delle tecnologie permette di identificare sia le basi biochimiche delle malattie e i relativi target, che i *leads*, di svilupparli e, in molti casi, di fornire i processi per produrli e controllarli. **Nella terza parte** si riportano i risultati di una indagine puntuale sul sistema di ricerca e sviluppo delle tecnologie per la vita dell'area milanese. L'indagine è stata rivolta sia alla ricerca di base che industriale, pubblica e privata, con particolare riferimento alla cura della salute senza tuttavia trascurare i settori dell'alimentazione e della protezione dell'ambiente.

Il sistema con circa 10.000 addetti, ha il suo punto di forza nella ricerca fondamentale finalizzata e nella sperimentazione clinica, mentre la ricerca dell'industria, pur presente, è frammentata e solo in pochi casi supera la soglia minima critica.

Nella quarta parte, infine, si discutono e si suggeriscono due iniziative, una nel settore della cura della salute, l'altro in quello alimentare le quali, sfruttando i punti di forza dell'area milanese, opportunamente integrati e promossi, potrebbero valorizzare significativamente l'intero sistema.

QUADRO DI RIFERIMENTO

1. LE BIOTECNOLOGIE: DEFINIZIONE E PECULIARITÀ

Le biotecnologie, secondo una definizione ufficiale dell'OCSE, consistono nell'utilizzazione integrata di discipline biologiche, discipline chimiche, dell'ingegneria e dell'informatica, allo scopo di produrre beni e servizi, mediante organismi viventi, cellule o loro costituenti. Così definite, esse sono nate essenzialmente nei primi decenni del Novecento con la fermentazione acetone-butilica e la produzione di acido citrico e, verso la metà del secolo, si sono molto sviluppate con gli antibiotici, gli enzimi, le vitamine, gli amminoacidi e altri prodotti di fermentazione. È solo nell'ultimo ventennio del secolo che sono nate e si sono sviluppate le "biotecnologie avanzate", le quali, alla definizione citata, aggiungono la capacità di "analizzare, modificare in modo predeterminato e controllare l'agente biologico utilizzato"; esse, anziché sfruttare la casualità, utilizzano in larga misura la progettualità. L'evento scientifico che ha determinato la nascita delle biotecnologie avanzate è stata la scoperta del funzionamento del DNA, mentre quello tecnico è stata la scoperta della possibilità di trasferire il DNA funzionante da un organismo a un altro (DNA ricombinante). Lo straordinario sviluppo delle scienze biologiche e delle tecniche a esse collegate che ne è conseguito, ha permesso di realizzare le enormi potenzialità della biotecnologia come fattore di innovazione in vari settori nella realizzazione di prodotti totalmente nuovi, nello sviluppo di processi produttivi, nel controllo della qualità, nella creazione di piante e animali migliorati e nella ricerca. La biotecnologia infatti non rappresenta un settore produttivo, bensì un insieme di tecnologie tra loro correlate utilmente applicabili in molti settori: in altre parole è una tecnologia "generica", trasversale e pervasiva.

2. I SETTORI APPLICATIVI

I settori merceologici nei quali la biotecnologia trova applicazione, e che vengono considerati in questa sede, sono quelli della cura della salute umana e animale, della chimica, dell'energia e della protezione dell'ambiente.

2.1 Cura della salute

Il principale campo di applicazione delle biotecnologie è certamente quello della cura della salute, nel quale si possono individuare tre ambiti di utilizzo: diagnostico, terapeutico, preventivo (vaccini). Sono stati sviluppati, approvati e commercializzati circa 200 prodotti di uso terapeutico e profilattico, oltre ad alcune centinaia di prodotti per la diagnostica; altri 500 prodotti circa sono in fase di sperimentazione clinica. Un'altra area importante di applicazione delle biotecnologie avanzate riguarda strumenti e procedure utili nella ricerca e sviluppo di nuovi prodotti farmaceutici e nuove tecniche terapeutiche.

Diagnostica

Oggi molte patologie possono essere diagnosticate più accuratamente, e soprattutto più precocemente, grazie alla sensibilità e alla precisione dei nuovi strumenti diagnostici biotecnologici

basati su reazioni immunitarie (*immunodiagnostica*) e sulla specificità della complementarità degli acidi nucleici (*diagnostica molecolare*).

La grande quantità di informazioni resa disponibile dal Progetto Genoma Umano, insieme alle tecniche diagnostiche innovative, ha aperto la strada per l'identificazione di malattie genetiche, o predisposizioni a patologie, che oggi non possono essere scoperte che quando è troppo tardi, consentendo così di evitarne o comunque attenuarne gli effetti. Altri vantaggi delle nuove tecnologie diagnostiche riguardano la possibilità di essere automatizzate, quindi di renderle meno costose, e la semplicità di uso, che ne permetterà la diffusione e lo spostamento dai laboratori attrezzati direttamente al paziente consumatore o a localizzazioni a questo più vicine, come le farmacie o gli studi medici specialistici. Al di là dell'uso prettamente diagnostico, le nuove tecnologie trovano altre importanti applicazioni nella rivelazione di contaminanti biologici e chimici negli alimenti e nell'ambiente.

Terapeutica

Le prime e finora più importanti applicazioni terapeutiche riguardano le *proteine terapeutiche* e gli *anticorpi monoclonali*.

Le *proteine terapeutiche* prodotte con la tecnica del DNA ricombinante possono essere sostanze presenti come tali nell'organismo umano - nel quale esplicano importanti, specifiche funzioni - o le stesse sostanze variamente modificate mediante fusione con altre o mutazione del gene che le codifica e dotate di significativi vantaggi applicativi. Esse appartengono a più classi terapeutiche: ormoni e fattori di crescita (insulina, ormone della crescita), proteine del sangue (fattori di coagulazione, trombolitici, eritropoietina), immunomodulatori e antitumorali (interleuchine, interferoni), antinfiammatori (antinterleuchine).

Gli *anticorpi monoclonali* sono prodotti con la classica tecnologia degli *ibridomi* (cellule ottenute dalla fusione di un linfocita produttore di un anticorpo con una cellula trasformata capace di crescere in coltura) o, più recentemente, mediante clonaggio dei geni che li codificano in una cellula o in un microrganismo. Essi, dapprima utilizzati quasi esclusivamente nella diagnostica immunologica, hanno trovato successivamente importantissime applicazioni terapeutiche determinate largamente dagli sviluppi tecnologici che hanno permesso di produrre anticorpi monoclonali umanizzati o addirittura umani. A oggi sono stati approvati farmaci a base di anticorpi monoclonali per la terapia dell'artrite reumatoide, dell'asma, di alcune forme tumorali, di patologie cardiovascolari, per la prevenzione del rigetto nei trapianti d'organo e altro.

Altre applicazioni biotecnologiche nell'ambito terapeutico, validate sotto gli aspetti tecnico e scientifico e in fase di sviluppo con elevate probabilità di successo, sono quelle delle cellule staminali, della terapia genica e dell'interferenza dell'RNA. Le cellule staminali in particolare, hanno già dato risultati positivi nella terapia della leucemia, ed è ragionevole prevedere risultati importanti a tempi non molto lunghi.

Vaccini

Il settore dei vaccini è stato particolarmente avvantaggiato dalle tecniche del DNA ricombinante e dalle tecnologie di ingegneria genetica a essa correlate. Ciò appare quasi ovvio quando si pensi che la stragrande maggioranza degli antigeni, che sono la base dei vaccini, sono proteine e che queste sono il punto di arrivo dell'ingegneria genetica. Essa permette di identificare il gene che codifica la proteina immunogena, l'antigene per l'appunto, e di trasferirlo dall'organismo patogeno - generalmente un batterio o un virus - a un altro organismo - un batterio o un lievito del tutto innocui - che lo produrrà in quantità senza particolari problemi di sicurezza per i lavoratori addetti, con costi più bassi e originerà un prodotto attivo e senza effetti collaterali gravi. Si ricorda che

i vaccini prodotti con le tecniche tradizionali di attenuazione della virulenza del patogeno o, nel caso di vaccini virali, mediante coltura su uovo embrionato possono dare, anche se non frequentemente, pesanti effetti collaterali. Parecchie decine di vaccini innovativi sono già stati ottenuti, altri sono stati fortemente migliorati e sono entrati nella pratica profilattica comune. Vaccini concettualmente nuovi che, anziché l'antigene proteico, utilizzano direttamente il gene che lo codifica, sono allo studio e possono rappresentare ulteriori notevolissime innovazioni per tutto il settore.

Ricerca e sviluppo di nuovi farmaci e nuove terapie

Il processo di sviluppo di un nuovo farmaco, dalla scoperta alla industrializzazione e alla commercializzazione è complesso, molto lungo e costoso. Esso richiede in media 12 anni di tempo con un costo medio totale di oltre 800 milioni di dollari. La produttività del ciclo di sviluppo in termini numerici è straordinariamente bassa. Per ottenere un farmaco da immettere sul mercato è necessario partire da oltre 1.000 molecole diverse, che saranno eliminate via via che il processo procede: solo una o due supereranno tutti i successivi, stringenti scrutini e arriveranno in fondo al processo di selezione, originando un farmaco. Schematicamente il processo di ricerca e sviluppo di un nuovo farmaco consiste nelle seguenti successive fasi di attività:

a) Ricerca (*drug discovery*)

- identificazione del *target*
- validazione del *target*
- identificazione del *lead*
- ottimizzazione del *lead*

b) Sviluppo (*drug development*)

- test preclinici
- sperimentazione clinica
- approvazione alla commercializzazione

Il costo totale medio e la sua ripartizione nelle singole fasi è riportato nella Figura 1.

Figura 1 - Costo di ogni fase del processo di ricerca e sviluppo di nuovi farmaci (milioni \$).

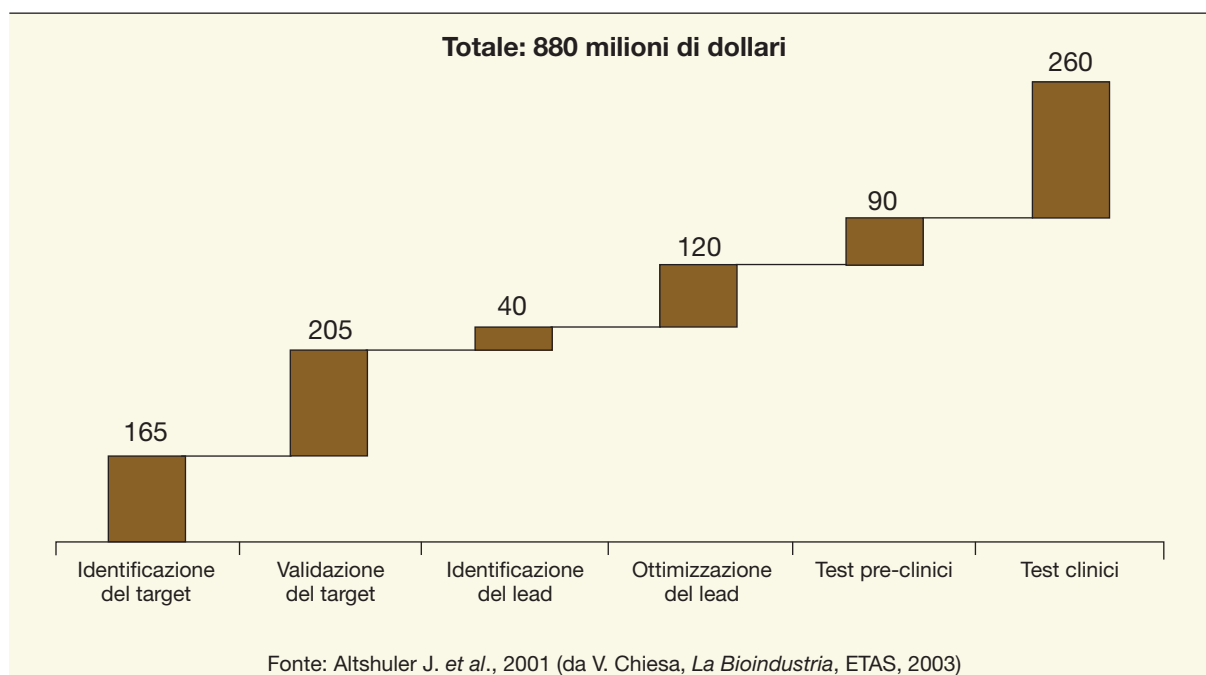
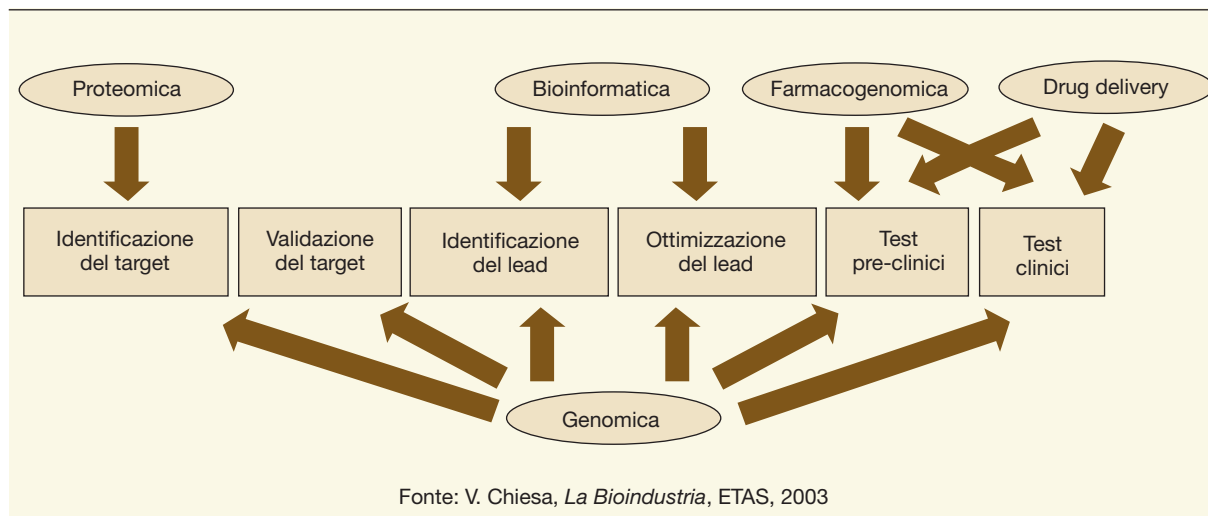


Figura 2 - Impatto delle biotecnologie sul processo di ricerca e sviluppo di nuovi farmaci.

Una delle principali direzioni nelle quali le imprese indirizzano i propri sforzi è, oltre alla ricerca di nuovi ritrovati, la messa a punto e l'applicazione di tecnologie che consentano di migliorare il modo di condurre tale processo abbreviandone i tempi, riducendone i rischi e abbassandone i costi. Le biotecnologie hanno consentito di sviluppare piattaforme tecnologiche nuove che contribuiscono in modo significativo a raggiungere questi obiettivi come schematizzato nella Figura 2.

Un impatto particolarmente importante hanno, a questo scopo, la genomica e la proteomica con il fondamentale contributo di altre tecnologie, come il DNA ricombinante, la PCR e, più recentemente, i DNA *microarrays*, la farmacogenomica, i modelli cellulari e animali e, infine, la bioinformatica e le tecniche di *drug delivery*.

La genomica, sia strutturale che funzionale, offre ampie opportunità di miglioramento nelle prime fasi del processo di ricerca e sviluppo, in particolare nella ricerca e identificazione del *target* e del *lead* con sostanziali incrementi del livello di produttività.

La proteomica permette di identificare le proteine prodotte in una data cellula, tessuto od organo nelle differenti condizioni, per esempio in condizioni normali o patologiche, e con questo ricavare informazioni preziose sulla causa della malattia utilizzabili per l'identificazione del *target* più interessante e, successivamente, del prodotto più adatto per rimuoverla.

L'uso dei DNA *microarrays*, all'interno della proteomica, collegando questa con la genomica, consente di individuare, sempre in condizioni definite, l'effetto di patologie o comunque di condizioni particolari, sulla espressione dei geni e con questo definire *target* molto precisi e programmare farmaci mirati. Le informazioni già disponibili sulla genomica e sulla proteomica - e quelle ulteriormente e intenzionalmente prodotte dal ricercatore interessato - sono moltissime; la loro interpretazione a livello singolo, ma soprattutto quella delle loro interrelazioni, non può essere fatta che utilizzando opportuni programmi di bioinformatica.

L'utilizzazione di modelli avanzati *in vitro* o *in vivo*, che presentino strette correlazioni con la condizione patologica, è di grande utilità: essa riduce i costi della ricerca e ne aumenta la probabilità di successo nella misura in cui il modello è rappresentativo della malattia. Le biotecnologie avanzate permettono appunto di produrre modelli adeguati e ben consolidati.

Un'altra tecnologia di grande importanza - che si prevede cambierà notevolmente il modo di affrontare la cura della salute e quindi della ricerca dei farmaci - è la farmacogenomica: nello sviluppo del farmaco essa tende a identificare l'insieme delle caratteristiche che i pazienti da trattare devono avere per non incorrere in effetti collaterali, mentre individuerà varianti dello stesso

farmaco adatte a chi tali caratteristiche non abbia. La selezione ragionata dei pazienti da trattare porterà a evitare complicazioni prevedibili e abbasserà il costo della sperimentazione clinica.

La tecnologia del *drug delivery*, infine, ricerca la forma più appropriata di somministrazione del principio attivo.

L'insieme delle accennate tecnologie - indicate di solito come *enabling technologies* - arreca sicuramente sostanziali vantaggi in termini di aumentata efficacia e produttività del processo di ricerca e sviluppo di un farmaco con sensibile riduzione dei relativi costi; esse tuttavia richiedono un investimento importante in ricerca allo scopo di mettere a punto e ottimizzare le varie tecnologie. Un'alternativa conveniente è quella di instaurare collaborazioni con imprese specializzate di biotecnologia, dotate appunto di *expertise* nello specifico settore: le *enabling technology supply companies*.

2.2 Chimica ed energia

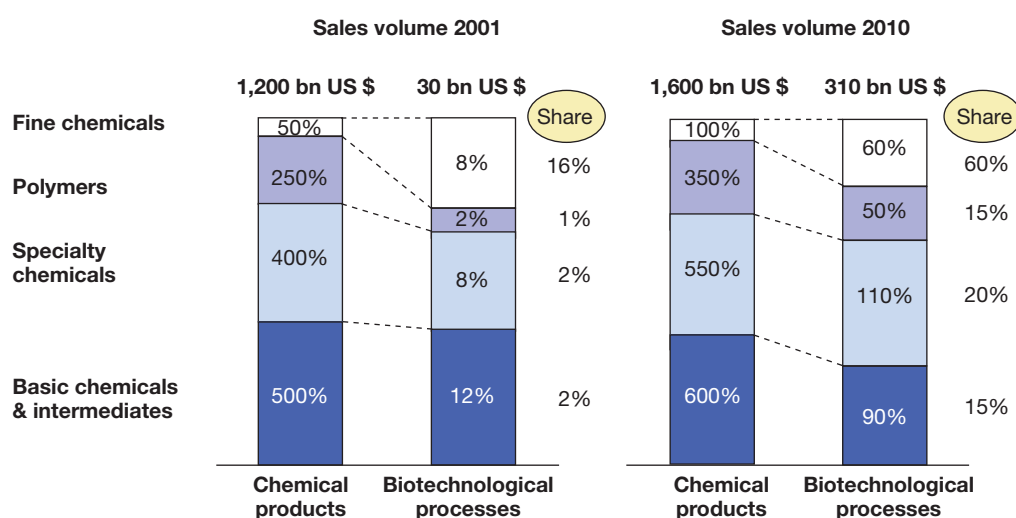
La biotecnologia sta avendo un effetto importante anche su questo settore con la messa a punto di processi produttivi per la chimica e l'energia, che consentono di migliorare le caratteristiche dei prodotti, di semplificare i cicli di lavorazione, di valorizzare ed incrementare l'uso di materie prime rinnovabili, di ridurre in molti casi i costi di produzione, nonché i costi per la protezione ambientale e il risparmio energetico.

Si prevede una fortissima espansione dei processi biotecnologici: essi passeranno dai 30 miliardi \$ del 2001 a 310 miliardi nel 2010; i *fine chemicals* prodotti per via biologica, in particolare, passeranno da 8 a 60 miliardi \$. Si veda a proposito la Figura 3.

Dati importanti si hanno anche per l'energia: la produzione mondiale di *bioetanolo* è più che raddoppiata tra il 2000 e il 2005, mentre la produzione di *biodiesel* è aumentata nello stesso periodo di circa quattro volte.

I prodotti ottenibili con processi biotecnologici sono moltissimi (parecchie centinaia); essi hanno caratteristiche, valore unitario e valori di mercato molto differenti, che vanno da prodotti *bulk*

Figura 3 - Previsione dello sviluppo dei processi produttivi chimici e biotecnologici dal 2001 al 2010.



Fonte, ACHEMA 2006. (Estratto dal documento finale del gruppo "Biotecnologie industriali" del Comitato Nazionale per la Biosicurezza e le Biotecnologie, 2006)

(basso valore unitario e grande volume: etanolo, acido glutammico, acido citrico, ecc.) a prodotti con caratteristiche di mercato opposte (enzimi, antibiotici, statine, ecc.).

Le biotecnologie avanzate contribuiscono significativamente allo sviluppo di queste applicazioni mediante l'isolamento e la caratterizzazione di nuovi enzimi e microrganismi e il miglioramento genetico e biochimico di quelli esistenti.

Altre importanti innovazioni introdotte riguardano i bioreattori e i sistemi di controllo del processo, nonché nuove tecnologie di estrazione e purificazione del prodotto utilizzando, per esempio, membrane filtranti o colonne di immunoaffinità.

2.3 Protezione dell'ambiente

Le biotecnologie stanno penetrando in modo significativo nel mercato delle tecnologie ambientali con diverse linee applicative. Si tratta di un mercato consistente stimato, limitatamente ai Paesi OCSE, in 400 miliardi \$/anno, comprendendo impianti, prodotti, apparecchiature, trattamenti, smaltimenti e bonifica dei siti contaminati. Le biotecnologie sono in fase di utilizzazione industriale particolarmente in alcuni specifici ambiti.

Trattamento effluenti gassosi

In questo settore applicativo, le biotecnologie sono impiegate per la realizzazione di *biofiltri*, costituiti da un supporto solido inerte, che sostiene una flora microbica selezionata per la sua capacità di degradare i prodotti contaminanti l'effluente.

Trattamento effluenti liquidi. Questo è il settore dove le applicazioni biotecnologiche hanno la maggiore tradizione.

Esse sono basate sull'impiego di fanghi attivi in condizioni aerobiche o anaerobiche; nel primo caso, le sostanze organiche contaminanti vengono ossidate ad acqua e anidride carbonica, mentre nel secondo vengono in parte ossidate a CO₂ e in parte ridotte a metano, a costituire il cosiddetto biogas, che può essere utilizzato come vettore energetico.

Gli altri contaminanti (sostanze azotate, sostanze minerali, ecc.) vengono incorporati nelle strutture cellulari e possono quindi essere rimossi per filtrazione o decantazione di queste. In entrambi i casi si sono avuti sviluppi promettenti con l'utilizzo di colture speciali e specifiche di microrganismi.

Bonifica dei siti contaminati

Le biotecnologie impiegate per questo campo applicativo si basano sull'attività degradante dei microrganismi. Questa può essere potenziata in vari modi: aumentando la concentrazione di ossigeno nel suolo mediante arature o insufflazione di aria, aumentando la crescita microbica mediante aggiunta al suolo di adatti nutrienti o aggiungendo al terreno colture selezionate per la loro capacità di degradare gli agenti contaminanti.

3. LA BIOINDUSTRIA

Lo sviluppo industriale e lo sfruttamento commerciale delle numerose applicazioni possibili delle biotecnologie è stato ed è tuttora notevole: il mercato mondiale di prodotti biotecnologici per la sola cura della salute, che peraltro rappresenta oltre 80% dell'intero mercato biotecnologico, è stimato in 80 miliardi \$/anno, e quello italiano in 3,5 miliardi.

Le imprese biotecnologiche in Europa e Stati Uniti sono più di 4.000; quelle operanti in Italia (incluse le filiali di multinazionali) sono circa 230.

3.1 Tipologie di impresa

Esistono essenzialmente due tipologie di imprese operanti nelle biotecnologie: quelle già attive, in un modo o nell'altro, nel settore biologico, nelle quali l'introduzione del know how biotecnologico ha costituito e costituisce un potente mezzo di innovazione e, quindi, di competitività, e quelle che delle biotecnologie avanzate sono una diretta conseguenza e sono nate appositamente per realizzarne le potenzialità economiche (*imprese dedicate*).

Le prime, nella grande maggioranza dei casi, sono grandi o medie imprese farmaceutiche, che utilizzano le biotecnologie avanzate nella ricerca di nuovi prodotti o nello sviluppo dei processi produttivi: esse hanno stretti rapporti con la ricerca di base delle Università e degli enti di ricerca (sia per la formazione del personale tecnico che per la realizzazione di particolari specifici progetti, o parti di progetti) e con le imprese biotecnologiche dedicate, con le quali instaurano complessi ed articolati rapporti di *partnership* per lo sviluppo e la commercializzazione dei nuovi prodotti.

Le imprese biotecnologiche dedicate, nate sul modello di quelle del settore ICT della *Silicon Valley* in USA, sono caratterizzate da:

- elevato contenuto tecnico scientifico;
- rapporti stretti con le Università e gli Enti di ricerca;
- attitudine all'attività di *discovery* di nuovi prodotti e nuovi processi;
- disponibilità a instaurare rapporti flessibili con imprese integrate (*joint ventures*, ricerche su commessa, ecc);
- attività di trasferimento della ricerca di base alla grande impresa;
- generazione di occupazione qualificata (laureati e tecnici);
- opportunità di investimento per *venture capitalists*, banche d'affari e grandi imprese.

Il processo di nascita di una nuova impresa (*start up*) è il risultato dello spirito imprenditoriale di una o più persone che dispongono di un'idea innovativa o, più frequentemente, di ritrovati originali da sviluppare e sfruttare commercialmente. In generale, i fondatori provengono dall'ambiente universitario e della ricerca pubblica, oppure dai laboratori di grandi imprese. Nel primo caso si parla di *spin off universitari*, nel secondo di *spin off industriali*, per indicare che la nuova impresa è nata per gemmazione sulla base dei risultati delle attività svolte nell'ambito di un'organizzazione accademica o di un'impresa.

La base per uno *spin off accademico* è costituita da un'idea, da un composto o da una tecnologia maturati e validati presso una Università o altro Ente di ricerca, che potrebbero permettere di sviluppare prodotti o servizi commercializzabili originali o, comunque competitivi. L'Università può partecipare al capitale dell'impresa o richiedere *royalties* sugli utili dell'impresa. Presso alcune Università sono attive strutture per il trasferimento delle tecnologie (*industrial liaison offices*) e facilitare la nascita delle imprese, altre dispongono di fondi specifici per il loro finanziamento. In Italia, il Ministero dell'Università e Ricerca dispone di un fondo per il finanziamento agevolato di progetti di ricerca collegati a *spin off universitari*.

Gli *spin off industriali* si realizzano quando una grande impresa dismette risultati di ricerche, che per varie ragioni non sono più di suo interesse strategico, o addirittura interi settori dei propri laboratori, in seguito a ristrutturazioni, e li cede ai ricercatori coinvolti insieme con significative facilitazioni (contratti di ricerca, apparecchiature, servizi, ecc.) in cambio di prevedibili future *joint ventures* o comunque di priorità nella commercializzazione dei prodotti che si otterranno (*first refusal rights*).

I profili di business delle imprese dedicate di biotecnologia sono variabili, ma possono essere fondamentalmente ricondotti ai seguenti tipi:

- imprese integrate: sviluppano un prodotto o un processo dalla fase di scoperta fino alla commercializzazione;
- imprese di ricerca: sviluppano solo parzialmente i prodotti o processi, giungendo a identificare la concreta possibilità di successo commerciale e il reale interesse a proseguire lo sviluppo, per il quale intervengono successivamente in vario modo grandi imprese o imprese integrate di biotecnologia;
- piattaforme tecnologiche: hanno l'obiettivo di sviluppare tecnologie che utilizzano come servizi per conto di altre imprese.

3.2 Il finanziamento della bioimpresa

Caratteristica peculiare delle imprese biotecnologiche è la necessità di capitali per finanziare la ricerca necessaria per sviluppare il proprio prodotto fino alla commercializzazione; come si è già detto, infatti, queste imprese nascono su un'idea e sulle capacità di svilupparla, mai su un prodotto già sul mercato. Le fonti di finanziamento sono differenti da caso a caso e, a seconda dello stadio nel quale l'impresa si trova, si ricorre a *business angels*, *venture capitalists*, banche d'affari, grandi imprese (*corporate venturing*), incubatori e parchi scientifici e tecnologici, istituzioni pubbliche.

Nelle prime fasi di sviluppo dell'impresa, è comune l'intervento di piccoli finanziatori privati (*business angels*) o del capitale di rischio (*venture capital*). Molto diffuso in Europa, soprattutto in Francia e Germania, l'intervento delle istituzioni pubbliche nazionali o locali, meno comune - ma presente e auspicato - in Italia.

I parchi scientifici e gli incubatori di solito intervengono attraverso la messa a disposizione di laboratori, uffici, servizi logistici e talvolta apparecchiature. Molte grandi imprese entrano nel capitale sociale dell'impresa, sia nella fase di *start up* che successivamente, allo scopo di monitorare direttamente le idee e i risultati interessanti e successivamente partecipare direttamente alla loro industrializzazione e commercializzazione.

3.3 I fattori di successo

La nascita e la crescita di imprese biotecnologiche innovative di successo è legata alla presenza in rapporti variabili di una serie di fattori che si riassumono a seguito.

Validità tecnica e imprenditoriale del risultato o dell'idea di partenza e sua copertura brevettuale: naturalmente un'impresa può nascere anche soltanto sulla base di un'idea, che però deve tradursi al più presto in un brevetto.

Disponibilità delle tecnologie necessarie e della possibilità e capacità di implementarle: molto importanti a questo fine sono la vicinanza geografica di buone istituzioni di ricerca di base, come Università e ospedali di ricerca, quali fonti di conoscenza e di personale preparato, così come la presenza di organizzazioni per trasferimento tecnologico, come anelli di contatto tra ricerca di base e imprese, nonché di incubatori che offrano spazi, laboratori e altre *utilities* a prezzi ragionevoli.

Capacità manageriali: sono essenziali per individuare idee valide sul piano economico e imprenditoriale, e successivamente acquisire i capitali e le altre risorse necessarie per svilupparle.

Disponibilità di capitali adeguati: al di là delle fondamentali fonti di finanziamento citate, un punto di criticità, soprattutto nelle prime fasi di vita delle *start up*, riguarda la possibilità di ricorrere a piccoli finanziamenti agevolati da parte di istituzioni nazionali o locali; sono questi che permettono molte volte di superare le delicate fasi iniziali, nelle quali è difficile coinvolgere gli investitori istituzionali, i quali tendenzialmente investono nelle più facilmente valutabili e controllabili imprese in fasi avanzate di sviluppo.

4. I DRIVER DELLO SVILUPPO BIOTECNOLOGICO

L'applicazione e lo sviluppo delle biotecnologie inerenti ai settori considerati in questa sede, già oggi rilevanti sul piano economico, sono inevitabilmente destinati a crescere. I fattori trainanti sono essenzialmente costituiti dall'esistenza di importanti problemi irrisolti combinata con la disponibilità di conoscenze e di tecnologie che ne rendono possibile la soluzione.

Nel settore della cura della salute, in particolare, l'esigenza di farmaci nuovi e migliori sotto gli aspetti dell'efficacia e tossicologici, è fortemente sentita soprattutto per la cura dei tumori, delle malattie degenerative e cardiovascolari e per la terapia antivirale.

La produttività della ricerca farmaceutica basata su approcci tradizionali è diminuita e i costi per l'individuazione e lo sviluppo di un nuovo farmaco sono aumentati in modo notevolissimo. La conoscenza dei meccanismi molecolari alla base delle varie patologie e la disponibilità di tecniche capaci di sfruttarli aumentano la capacità di predire l'efficacia e la tollerabilità delle nuove molecole in studio: particolarmente importante a tal fine, è la possibilità di identificare e validare specifici *target* e di mettere a punto modelli della patologia, o ancora, la possibilità di stratificare i pazienti in base alla loro prevista risposta al farmaco in studio.

Altri fattori trainanti, sempre per la cura della salute, sono rappresentati dallo sviluppo di nuovi indirizzi terapeutici, come per esempio le terapie personalizzate, quelle rigenerative, e linee terapeutiche totalmente nuove, come quella dell'interferenza dell'RNA.

Il forte aumento del costo sociale della cura della salute, legato a una legittima aspirazione individuale e all'aumento della durata della vita, costituisce un potente *driver* verso l'adozione della medicina preventiva, e quindi dei vaccini e della diagnostica precoce, che rende la terapia più efficace e meno onerosa.

Per la stessa ragione sarà necessario ridurre i prezzi, e quindi i costi, dei farmaci: anche per questo le biotecnologie possono essere utilmente applicate soprattutto nel caso di farmaci prodotti per via biologica come gli antibiotici, i vaccini e, in generale, i farmaci biologici come le proteine terapeutiche e gli anticorpi monoclonali.

Passando a considerare i settori della chimica e dell'energia, il principale fattore trainante risulta dalla combinazione del prezzo del grezzo, attualmente molto elevato e destinato a ulteriori aumenti, con la possibilità offerta dalle biotecnologie di sostituirlo con materie prime rinnovabili, come base per la produzione di parecchi importanti *chemicals* e, in una certa misura, anche di vettori energetici. Un'ulteriore spinta in questa direzione è fornita dal ridotto effetto dannoso sull'ambiente esercitato dai processi produttivi biotecnologici rispetto a quelli chimici convenzionali. In questo settore l'Italia ha un'importante tradizione di produzioni biologiche (fermentazione) e quindi dispone di personale preparato a livello industriale e di indotto.

Infine, ma non certamente meno importante, è da ricordare che l'Italia dispone di una ricerca biotecnologica di base di ottimo livello, un prerequisito indispensabile per lo sviluppo e l'applicazione competitiva di processi produttivi essenzialmente basati sulla conoscenza.

LE PRINCIPALI TECNOLOGIE DELLA VITA (BIOTECNOLOGIE)

5. CRITERI DI IDENTIFICAZIONE DELLE FILIERE BIOTECNOLOGICHE DI INTERESSE GENERALE

Il settore della cura della salute, senza dubbio quello più interessato alle biotecnologie avanzate, sta attraversando a livello globale un periodo di intensa evoluzione.

L'aumento della durata della vita e della consapevolezza del diritto alla cura della salute, hanno determinato un forte aumento nella richiesta di cure con relativo aumento dei costi per i sistemi sanitari sociali, che premono sui loro fornitori e impongono sconti sempre più elevati.

I produttori dei Paesi emergenti mettono sul mercato principi attivi e anche specialità a prezzi fortemente competitivi, che tendono a escludere i Paesi industrializzati dal business dei prodotti a limitato contenuto innovativo.

Di conseguenza, una strategia dei Paesi industrializzati, che contemporaneamente recuperi la competitività e migliori il servizio ai cittadini, deve necessariamente essere orientata alla ricerca e all'innovazione dei prodotti e dei processi.

In sintesi, il sistema produttivo è sempre più impegnato sui seguenti obiettivi:

- identificare farmaci nuovi o comunque migliori per la terapia di patologie attualmente non o insufficientemente curate (tumori, malattie virali e degenerative, ecc.);
- sviluppare nuove aree terapeutiche (terapia rigenerativa, interferenza dell'RNA, ecc.);
- sviluppare terapie personalizzate;
- sviluppare la medicina preventiva;
- ridurre i costi di produzione dei farmaci.

Altri settori produttivi in evoluzione sono quelli della chimica ed energia e della protezione dell'ambiente. Anche in questi le biotecnologie possono contribuire a un nuovo posizionamento strategico attraverso l'uso di materie prime rinnovabili e la riduzione delle contaminazioni ambientali.

Le filiere biotecnologiche che comprendono gli obiettivi/driver sopradetti, e le biotecnologie utilizzabili per il raggiungimento di ciascuno degli obiettivi, sono oggetto delle schede di approfondimento illustrate oltre.

Nella Tabella 1, è riportato il livello di coinvolgimento delle varie biotecnologie nelle quattro filiere considerate per il raggiungimento dei rispettivi obiettivi/driver.

Mentre ciascuna filiera è caratterizzata da un elevato livello di coinvolgimento di specifiche tecnologie, altre tecnologie vi possono essere coinvolte a livelli più bassi.

Alcune tecnologie, per esempio, come il DNA ricombinante, la genomica o la fermentazione, sono diffuse, seppure a livello più basso, in tutte o quasi le filiere. Nelle schede di approfondimento tuttavia, esse saranno attribuite alla filiera nella quale sono maggiormente coinvolte limitandosi a richiamarle nelle altre.

Tabella 1 - Matrice di correlazione: driver/tecnologia				
Tecnologia \ Driver	Tecnologie per la ricerca di nuovi farmaci e terapie personalizzate	Nuove aree terapeutiche	Medicina Preventiva	Processi produttivi biotecnologici
Genomica	++	+	+	o
Proteomica	++	o	+	o
Farmacogenomica	++	+	o	o
Modelli farmacologici	++	+	o	o
High-throughput screening	++	o	o	o
Bioinformatica	++	+	+	o
Drug delivery systems	++	+	+	o
Interferenza dell'RNA	+	++	+	o
Cellule staminali e terapia rigenerativa	o	++	o	o
Vaccini	o	o	++	o
Sonde molecolari	+	+	++	o
PCR	+	+	++	o
DNA fingerprinting	+	o	+	o
DNA microarrays	+	+	++	o
Immunodiagnostica	o	o	++	o
Produzione biotecnologica di anticorpi monoclonali	o	o	o	++
Produzione di proteine ricombinanti	o	o	o	++
DNA ricombinante	+	+	+	++
Fermentazione	+	o	+	++

Livello di coinvolgimento

++	elevato
+	medio
o	scarso o assente

6. LE FILIERE BIOTECNOLOGICHE DI INTERESSE GENERALE**6.1 Tecnologie per la ricerca di nuovi farmaci e terapie personalizzate**

Genomica, proteomica, farmacogenomica, modelli di studio farmacologici, high-throughput screening, bioinformatica, drug delivery systems

Nel precedente capitolo dedicato alla cura della salute, si è visto come il processo di ricerca e sviluppo di nuovi farmaci sia lungo, rischioso e costoso e come le biotecnologie abbiano consen-

tito la messa a punto di piattaforme tecnologiche nuove, che migliorano il modo di condurre tale processo rendendolo più efficiente.

Le più importanti e peculiari tecnologie utilizzate a questo scopo sono descritte di seguito; altre tecnologie, pure utilizzate, come, per esempio, quelle dei DNA *microarrays*, dell'interferenza dell'RNA o del DNA ricombinante, di uso più generale, sono descritte altrove e saranno qui solo richiamate quando necessario.

Descrizioni

Genomica

La genomica è lo studio della struttura, composizione, organizzazione ed evoluzione del genoma. Essa comprende anche la metabolomica, che studia i prodotti delle varie attività enzimatiche cellulari con particolare riferimento ai prodotti di biotrasformazione dei farmaci, i quali possono mostrare, a loro volta, attività farmacologica o essere di per sé tossici.

Al suo sorgere, la genomica si occupava solo della determinazione della sequenza denucleotidi del DNA (genomica strutturale), ma ben presto gli interessi si sono rivolti anche alla funzione dei geni e, in particolare, all'espressione genica (genomica funzionale).

La genomica funzionale mira ad assegnare a ciascun gene una funzione biochimica, fisiologica, cellulare o di sviluppo.

La ricerca del ruolo fisiologico giocato da diversi geni, può essere condotta analizzando quali geni vengano trascritti (o cessino di esserlo) in una cellula o tessuto esposti a stimoli particolari, per esempio una patologia.

A questo scopo, si confrontano gli RNA messaggeri estratti da un tessuto sano e da uno patologico; le differenze riscontrate tra i due tessuti permettono di risalire alla funzione dei geni differenzialmente espressi. I principali metodi utilizzabili a questo scopo sono la migrazione differenziale su gel di sequenze di cDNA (i cDNA sono le copie DNA degli RNA messaggeri) e le genoteche di sottrazione.

Questi metodi sono di particolare interesse perchè permettono di accoppiare direttamente osservazioni di tipo fisiologico con alterazioni dell'espressione genica di una cellula e hanno un eccezionale potenziale per l'identificazione di processi importanti per la crescita e il differenziamento cellulare, con indicazioni rilevanti per la comprensione di parecchi processi patologici.

Proteomica

La proteomica studia il "proteoma" che è l'insieme di tutti i possibili prodotti di natura proteica espressi in una cellula, incluse le isoforme e le modificazioni post-trascrizionali. Il proteoma è dinamico nel tempo, varia in risposta a fattori esterni e differisce sostanzialmente tra i diversi tipi cellulari di uno stesso organismo.

Un organismo ha espressioni proteiche radicalmente diverse nelle varie parti del suo corpo, nelle varie fasi del suo ciclo di vita e, in particolare, nelle differenti condizioni patologiche. Quest'ultima caratteristica, che si evidenzia e analizza mediante la proteomica differenziale, può contribuire significativamente, come si vedrà nel paragrafo delle relative applicazioni, ad aumentare l'efficienza del processo di ricerca di nuovi farmaci.

Farmacogenomica

La farmacogenomica studia le relazioni tra farmaci e genoma, con l'obiettivo di identificare le basi genetiche della variabilità della risposta clinica ai vari farmaci e la migliore terapia per la specifica malattia di un paziente, o gruppo di pazienti.

In una determinata popolazione, alcune persone presentano una risposta completa a una terapia, altre non presentano alcuna risposta, altre ancora presentano reazioni avverse.

Questa variabilità non è dovuta solo a meccanismi fisiologici di regolazione e a fattori ambientali, ma soprattutto alla costituzione genetica del singolo soggetto che, secondo alcuni autori, rappresenta più dell'85% della variabilità complessiva. Il profilo genetico di ogni individuo determina infatti sia le caratteristiche dei bersagli (*target*) dei farmaci, che delle proteine coinvolte nel processo del loro assorbimento e metabolismo.

La farmacogenomica, utilizzando essenzialmente tecniche di diagnostica molecolare, identifica geni o polimorfismi correlati alla risposta al farmaco, sia in termini clinici che di reazioni avverse, consentendo quindi di sviluppare farmaci mirati a determinati sottogruppi di pazienti e attivi su questi, idealmente, al 100%.

Modelli di studio farmacologici

Le nuove entità chimiche a potenziale attività farmacologica, disegnate per interagire con una specifica proteina bersaglio, vengono studiate inizialmente in sistemi *in vitro* (es. studi di legame ligando-recettore, oppure studi in organo isolato) o in colture cellulari per determinare l'attività del composto in esame. I composti più attivi verranno poi sottoposti a una serie di studi *in vivo*, in animali da laboratorio, per definirne le caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche e per determinarne la tossicità.

Queste tecniche di indagine, applicate tradizionalmente nei processi di ricerca e sviluppo di nuovi farmaci, sono state profondamente modificate e rese più affidabili e predittive applicando a esse le tecnologie avanzate di ingegneria genetica e di transgenesi, le quali hanno originato nuovi e importanti modelli di studio farmacologici, principalmente colture di cellule ingegnerizzate e animali transgenici.

Cellule ingegnerizzate. La possibilità di ingegnerizzare e studiare cellule umane, unita alla constatazione che la maggior parte dei bersagli dell'azione farmacologica è costituita da proteine, i cui geni clonati sono disponibili, ha attratto l'attenzione dei farmacologi, i quali hanno sviluppato una serie di saggi biologici basati su cellule ingegnerizzate capaci di esprimere un bersaglio relativo a una patologia umana, e un sistema rivelatore della sua presenza e attività, e quindi dell'effetto esercitato su di esso da potenziali farmaci. I principali vantaggi di questi modelli consistono nella presenza in essi di definiti *target* umani e nella possibilità di automatizzarne, anche in modo spinto, l'utilizzazione.

Uno dei parecchi modelli disponibili, che si cita a titolo esemplificativo, è costituito da cellule nelle quali sia stato clonato, sotto il controllo dello stesso promotore, il gene codificante la proteina bersaglio e un gene che codifica una proteina facilmente identificabile, la quale funziona da spia dell'espressione della proteina bersaglio cui è trascrizionalmente collegata. Proteine del secondo tipo sono la *luciferasi*, che agendo sul substrato *luciferina* provoca emissione di fotoni, o l'enzima *cloramfenicolo acetil transferasi*, che inattiva l'antibiotico cloramfenicolo del substrato permettendo la crescita batterica. Il gene aggiunto che le codifica si chiama genericamente *gene reporter*. Il modello, con le opportune variazioni, è applicabile per identificare sostanze capaci di inibire o stimolare la sintesi della proteina bersaglio.

Animali transgenici. Per molte malattie dell'uomo manca l'equivalente modello animale, e ciò condiziona e ritarda le ricerche per lo sviluppo dei farmaci terapeutici relativi.

Grazie alle tecniche del DNA ricombinante, è stato possibile produrre animali transgenici portatori di lesioni genetiche uguali a quelle responsabili di alcune malattie dell'uomo o di specifiche inattivazioni genetiche (animali *knock out*). La disponibilità di questi animali, in genere topini di laboratorio, non solo consente di comprendere a fondo gli eventi biochimici conseguenti all'alte-

razione di uno specifico gene responsabile della patologia, ma consente anche di associare in un solo esperimento gli studi della farmacocinetica e della farmacodinamica a quelli farmacologici, con una significativa riduzione dei tempi e dei costi. Gli esempi di animali transgenici modelli di patologie umane sono numerosi. Nel caso di patologie del sistema cardiovascolare, sono stati sviluppati ratti transgenici utilizzati nello studio di farmaci antipertensivi inserendo nel loro genoma i geni umani codificanti per la renina e l'angiotensinogeno. Sviluppi analoghi sono stati realizzati nel campo delle lipoproteine con la creazione di topi transgenici sovraesprimenti il recettore delle lipoproteine a bassa densità o dei loro ligandi ApoE ed ApoB.

Una applicazione molto promettente degli animali transgenici è la ricerca di farmaci antitumorali. Topi geneticamente modificati, in modo da esprimere specifici antigeni tumorali umani, sono utilizzati per lo studio di nuove forme di immunoterapia, mentre topi trasformati con l'oncogene umano *c-myc* sono predisposti a sviluppare il tumore della mammella e molto utili per la sperimentazione di farmaci e metodologie diagnostiche per questa importante neoplasia.

Animali geneticamente modificati come modelli per lo studio di farmaci, o delle basi biochimiche delle patologie, sono applicati per il sistema nervoso, per le malattie neurodegenerative, per il sistema endocrino, nelle malattie virali, nelle alterazioni del sistema immunitario, nell'artrite e altro ancora.

High-throughput screening

Per *high-throughput screening* (HTS) si intende un processo tramite il quale un numero molto elevato di molecole può essere esaminato, in modo automatizzato, per l'identificazione di una sua attività inibitoria (*antagonista*) o attivatoria (*agonista*) di un definito bersaglio biologico (recettore, enzima, ecc.). Lo scopo di questo tipo di screening consiste nell'identificare una molecola che abbia una struttura nuova e agisca sul bersaglio a concentrazione molto bassa, quindi con minori probabilità di causare, se somministrata, effetti collaterali.

La base biologica del sistema è rappresentata da colture cellulari ingegnerizzate, come descritto, *supra*, in "Modelli di studio farmacologici". Il sistema di scelta è quello di cellule umane, o comunque di cellule di mammifero; tuttavia, ragioni di costo, larga disponibilità di mutanti genetici e semplicità di uso, suggeriscono, quando possibile, di utilizzare colture di lievito opportunamente ingegnerizzato a esprimere la proteina umana bersaglio del farmaco. Nel lievito si possono studiare sistemi di trasduzione del segnale determinati da recettori umani accoppiati a proteina G, canali ionici umani, legame recettore-ligandi peptidici e molti altri.

Le colture cellulari scelte vengono cresciute in pozzetti, in piastre multi-colture (ogni piastra può supportare oltre 500 colture), in presenza e in assenza dei composti da studiare, i quali provengono da collezioni ottenute attraverso la chimica combinatoria. Il segnale prodotto da ciascuna coltura in risposta al composto aggiunto, è indice dell'attività dello stesso composto sul sistema biologico contenuto nella coltura, e quindi correlato all'attività farmacologica ricercata.

Per quanto riguarda la collezione di molecole ottenute con la chimica combinatoria, la filosofia per la sua costruzione è quella di utilizzare un'unica molecola come scheletro e aggiungere a questa diversi gruppi, anche in connessione tra loro. Una volta trovata la molecola attiva, lo screening successivo viene effettuato su analoghi congeneri che man mano offrano sempre migliori prestazioni. La maggior parte delle operazioni, biologiche, chimiche e di lettura dei risultati, sono automatizzate.

Bioinformatica

La bioinformatica è lo studio della struttura interna dell'informazione biologica; i suoi strumenti di indagine, oggi in continua evoluzione, rispondono alla necessità di manipolare l'eterogenea

massa di dati di provenienza biomedica facendo uso dei modelli teorici e degli strumenti pratici dell'informatica e della statistica.

Per quanto riguarda la sua specifica applicazione nella ricerca di nuovi farmaci, la bioinformatica permette di valutare in tempo reale la probabilità di successo di un nuovo principio terapeutico fin dalle prime fasi di studi clinici condotti in ospedali sempre più lontani tra loro, permettendo quindi di indirizzare o meno, la propria ricerca verso nuovi composti appartenenti alla stessa classe terapeutica. Inoltre, essa consente di valutare con rapidità e affidabilità la massa di dati fornita dallo *screening* automatizzato (HTS) dei composti in via di studio.

La ricerca farmacologica è centrata sulla scelta di un bersaglio cellulare con il quale il farmaco deve interagire e, come precedentemente accennato, la genomica e la proteomica stanno ampliando notevolmente il numero dei potenziali bersagli farmacologici. La cernita della massa di dati disponibili per la scelta del bersaglio candidato che abbia alte possibilità di successo, costituisce un punto cruciale. Esistono in proposito software specifici per l'analisi automatica di sequenze nucleotidiche e di strutture di proteine e recettori accumulate nelle banche dati che sono certamente di grande aiuto. Altre banche dati raccolgono i risultati di studi funzionali, i cambiamenti dell'espressione di geni specifici in seguito a trattamenti ormonali o farmacologici, i gel bidimensionali che visualizzano tutte le proteine espresse da una particolare cellula. Queste e altre banche dati, rendono superflui molti esperimenti, che potranno essere ritrovati in internet o in programmi ad accesso limitato.

Ne consegue che la familiarità, e la disponibilità di programmi informatici adeguati sono indispensabili per la produttività della ricerca di nuovi farmaci.

Drug delivery systems

Il termine "*drug delivery systems*" indica un insieme di tecnologie relative alla modalità di somministrazione dei principi attivi. La somministrazione di un farmaco rappresenta una fase critica, in quanto da essa dipende buona parte dell'efficacia del processo terapeutico e l'eventuale insorgenza di effetti collaterali.

Nel caso di principi attivi facilmente inattivabili dalle condizioni chimiche o dagli enzimi dell'organismo umano, come le proteine terapeutiche e, più recentemente, gli oligonucleotidi a doppio filamento ad attività RNAi (RNA interference), lo scopo principale è quello di conferire loro una più elevata stabilità, e con questo, la possibilità di esercitare il loro effetto.

L'incremento delle conoscenze ha fatto emergere la necessità e la possibilità di disporre di strumenti e tecnologie, per veicolare il principio attivo sullo specifico recettore bersaglio, concentrandolo sull'organo ammalato, senza interferenze su tutti gli altri organi e riducendo di conseguenza gli eventuali effetti collaterali.

Le principali tecniche per veicolare il principio attivo sono basate sull'uso di liposomi, polimeri organici o sintetici e anticorpi monoclonali.

I liposomi sono microscopiche gocce di fosfolipidi che incapsulano il farmaco e ne garantiscono un rilascio graduale e controllato nell'organismo. Quando necessario, essi vengono ricoperti con uno strato di un polimero inattivo come, per esempio, il polietilenglicol (PEG), che li rende indifferenti al sistema immunitario.

I polimeri di uso più comune sono derivati dell'acido lattico, come l'acido polilattico (PLA) e l'acido polilattico-co-glicolico (PLGA). Essi possono essere utilizzati sia per liberare il principio attivo lentamente per un lungo periodo di tempo, che per ritardarne il rilascio di un tempo stabilito.

Gli anticorpi monoclonali vengono legati al farmaco allo scopo di indirizzarlo con precisione verso le cellule o i tessuti che contengono l'antigene specifico per l'anticorpo stesso. Nel caso di farmaci antitumorali, per esempio, il loro legame con un anticorpo tipico del tumore permette di

raggiungere solo, o preferenzialmente, il tumore riducendo così gli effetti collaterali tossici tipici di questi farmaci.

Un contributo importante allo sviluppo dei *drug delivery systems* è esercitato dalle nanotecnologie attraverso la creazione di particelle a livello micro e nano, capaci di veicolare contemporaneamente sostanze ad affinità specifica per organi, tessuti o addirittura cellule e sostanze biologicamente attive. Notevole interesse sta destando la possibilità di realizzare nanosistemi per il *delivery* mirato (*nanotubes*, *dendrimers*, *nanopores*, *nanoshells*, *nanoparticles*) dei siRNA (small interfering RNA) in campo terapeutico oncologico.

Applicazioni

L'identificazione e la discussione delle applicazioni delle tecnologie sopra esposte fanno riferimento al loro utilizzo per la ricerca di nuovi farmaci, dunque a quanto già riportato nel Quadro di riferimento, al paragrafo a pagina 9 "Ricerca e sviluppo di nuovi farmaci e nuove terapie".

La genomica consente di migliorare il processo di ricerca di nuovi farmaci da due punti di vista, sia in termini di efficienza - a questo proposito, particolare importanza assume la genomica strutturale - sia in termini di efficacia, riducendo il tasso di fallimento attraverso la genomica funzionale.

La conoscenza della struttura genica permette, per esempio, di identificare e localizzare eventuali mutazioni patogene individuando il gene responsabile e rendendo possibile lo studio mirato di nuovi interventi terapeutici come la terapia genica o quella farmacologica sostitutiva.

Un'altra possibilità consiste nella trasfezione del gene responsabile in colture cellulari che saranno utilizzate per studiare in un sistema più semplice dell'intero organismo, la funzione biologica del gene e l'effetto biochimico della eventuale mutazione.

Colture cellulari nelle quali sia stato trasfettato il gene, normale o mutato, collegato a un gene reporter, costituiscono importanti modelli per lo *screening* di molecole in studio come potenziali farmaci.

Una tecnologia correlata alla genomica e utile per migliorare il processo di ricerca e sviluppo di nuovi farmaci è la farmacogenomica che studia le relazioni tra le caratteristiche genetiche dei pazienti e la risposta ai farmaci in termini di attività terapeutica e di effetti collaterali. La sua applicazione è particolarmente utile nella pianificazione della sperimentazione clinica: la selezione dei pazienti in base a caratteristiche genetiche ben definite riduce la variabilità della risposta e aumenta la possibilità di realizzazione del farmaco, limitando anche il costo della sperimentazione clinica. Lo sviluppo di questo modo di fare ricerca dei farmaci porterà a terapie sempre più personalizzate, più sicure e meno costose. Esse ridurranno l'ampiezza delle indicazioni di ogni singolo farmaco, ma renderanno possibile e più facile, lo sviluppo di più farmaci meglio adatti alle diverse popolazioni.

La proteomica applicata alla ricerca e sviluppo di nuovi farmaci, consente di identificare nuovi bersagli e informazioni utili per la ricerca di composti attivi su di essi (*lead*). Per fare questo, le proteine di un campione di un tessuto patologico, per esempio, il tessuto biotico di un tumore e quelle dello stesso tessuto sano, vengono separate in parallelo su un gel bidimensionale. La proteina presente solo nel primo campione, validata con opportune analisi biochimiche e statistiche, può costituire un target per quel tipo di tumore e, dopo cristallizzazione e analisi di diffrazione, fornire il modello per disegnare una molecola capace di inibirla.

Frequentemente tuttavia, il problema è più complesso perché richiede l'identificazione e lo studio delle interazioni fra più proteine, ciò che è la regola per patologie complesse, come per esempio quelle neoplastiche.

Attraverso analisi differenziali di confronto, trasfezione dei geni in colture cellulari e spet-

trometria di massa, è stato identificato un recettore di natura proteica, HER2 (*Human epidermal growth factor receptor 2*), la cui sovraespressione è strettamente correlata con il tumore del seno ed è condizionata dalla presenza di *Human growth factor* (HGF).

L'interrelazione fra i due si traduce nell'attivazione di specifici siti di fosforilazione che determinerebbero la proliferazione e la migrazione (metastasi) delle cellule neoplastiche. È sfruttando queste conoscenze che Genentech e Roche hanno ottenuto il farmaco *Herceptin* per la cura dei tumori del seno.

Un altro interessante esempio di interazioni proteiche è quella fra *h prune*, una proteina ubiquitaria scoperta per la prima volta in *Drosophila*, la proteina nm23 (*non metastatic 23*) e una fosfodiesterasi. La proteina nm23 ha un'azione di controllo sulla proliferazione cellulare e, soprattutto, sulla formazione di metastasi. È stato dimostrato che elevate espressioni di *h prune* disattivano, attraverso la fosfodiesterasi, la proteina nm23 con conseguente attivazione della motilità cellulare e quindi della formazione di metastasi. La proteina *h prune*, o meglio il complesso *h prune-fosfodiesterasi*, rappresentano dei bersagli per l'identificazione di farmaci che abbiano attività antimetastatica e ricerche in tal senso sono in corso.

Un'applicazione differente, ma altrettanto importante, afferisce sia alla ricerca preclinica avanzata che alla prima parte della sperimentazione clinica. L'analisi differenziale delle proteine prodotte in un paziente trattato con un farmaco e in uno non trattato, oppure prima e dopo il trattamento, permette di rivelare se la somministrazione del farmaco determina la produzione *ex novo* di una o più proteine che potrebbero provocare effetti collaterali anche gravi.

I *modelli di studio cellulari e animali* trovano applicazione nel processo di ricerca di nuovi farmaci in due punti diversi dello stesso.

I primi, costituiti da cellule ingegnerizzate, servono principalmente per identificare molecole dotate dell'attività farmacologica che si ricerca (*lead*); essi permettono di esaminare centinaia o migliaia di molecole in tempi brevi e con costi bassissimi e, come tali, sono una delle basi dello *screening* ad alta efficienza (*high-throughput screening*). I secondi, costituiti essenzialmente da animali di laboratorio geneticamente modificati, sono utilizzati nelle fasi più avanzate della sperimentazione preclinica e permettono di caratterizzare il potenziale farmaco per attività farmacologica, farmacocinetica e farmacodinamica contemporaneamente.

Lo *screening ad alta efficienza* (HTS), la *chimica combinatoria* e la *bioinformatica* sono tecnologie insostituibili nella ricerca di nuovi farmaci; esse sono applicate nella fase di ricerca del lead e nella sua ottimizzazione: la bioinformatica in particolare permette di realizzare test attraverso simulazioni *in silico*, accelerando il processo di selezione dei *leads*, nonché di ridurre il costo dei test preclinici e clinici.

La tecnica dei *drug delivery systems*, applicata da tempo, ha assunto una nuova importanza legata alla necessità di proteggere, vuoi dall'attacco enzimatico vuoi da quello del sistema immunitario, sostanze a essi particolarmente sensibili come le proteine e gli oligonucleotidi. La capacità di un farmaco di raggiungere e agire specificamente su un organo bersaglio può essere acquisita legandolo in qualche modo a un anticorpo monoclonale specifico per un antigene del bersaglio. Gli anticorpi monoclonali possono quindi essere applicati sia direttamente come farmaci che come *drug delivery systems* (oltre che naturalmente come diagnostici).

Stato dell'arte

Le tecnologie utili per la ricerca di nuovi farmaci (*enabling technologies*) sono tutte in fase emergente. Esse sono derivate dalle conoscenze genetiche originate dalla identificazione della struttura del genoma umano e del suo funzionamento, ivi incluse le complesse interazioni tra i suoi componenti. Fa eccezione la tecnologia dei *drug delivery systems*, nota e applicata da molti anni,

che però è stata modificata e adattata ai nuovi prodotti di origine biotecnologica, come le proteine terapeutiche o quelli dell'RNAi e all'uso di anticorpi monoclonali.

L'applicazione di tutte, o di parte, delle tecnologie descritte richiede competenze specifiche che vanno al di là di quelle normalmente presenti in laboratori di ricerca industriali, da cui la opportunità, o necessità, di instaurare stretti rapporti di collaborazione con la ricerca universitaria o con imprese dedicate, le *enabling technologies supply companies*.

Lo sviluppo di queste tecnologie, teso a renderle di più facile applicazione, costituisce buona parte della ricerca in corso. Essa è in parte finanziata da istituzioni pubbliche, in quanto non competitiva e di utilità generale, e porterà senza alcun dubbio a un uso generalizzato a beneficio delle imprese più progredite e del cittadino che i farmaci utilizza.

Prospettive di sviluppo

La genomica strutturale ha avuto un enorme sviluppo; la maggior parte dei geni umani, e di altri organismi importanti per la ricerca, sono stati identificati e caratterizzati. Gli interessi sono ora rivolti alla funzione dei geni, delle proteine e in particolare all'analisi dell'espressione genica.

È, questa, la genomica funzionale, la quale studia la funzione dei geni a livello biochimico, cellulare e fenotipico utilizzando la trascrittomica, che studia per l'appunto i trascritti genici e la metabolomica, cioè l'identificazione della struttura e della distribuzione di piccole molecole (metaboliti) derivate dal metabolismo dei farmaci. Questa disciplina si sta rivelando di cruciale importanza per lo sviluppo di altre come la farmacogenomica.

In questo ambito, particolare importanza assume la proteomica, cioè lo studio della struttura e della funzione delle proteine cellulari; sono loro che permettono di distinguere i diversi tipi di cellule le quali, anche se hanno lo stesso genoma, si differenziano in base ai tipi di geni che sono espressi e alle proteine prodotte. Analogamente, cellule malate spesso producono proteine assenti in quelle sane o viceversa. È per questo che i ricercatori, tanto nei laboratori privati quanto in quelli accademici, stanno cercando di catalogare tutte le proteine umane e scoprire come interagiscono tra loro. Lo scopo principale di questa attività è quello di poter concepire farmaci più efficaci e con minori effetti collaterali.

Sfortunatamente lo studio del proteoma è molto più complesso di quello del genoma: le migliaia di proteine prodotte dalla cellula, oltre che differire per la composizione amminoacidica determinata dalla struttura del gene che le codifica, subiscono modificazioni post-traduzionali essenziali per il loro funzionamento, ciò che ne aumenta ulteriormente il numero. Per quanto riguarda poi le funzioni esercitate, la maggior parte delle proteine agisce attraverso interazioni più o meno complesse. Queste possono essere individuate e valutate solo attraverso l'uso di adatti programmi forniti dalla bioinformatica. Le ricerche in corso sullo specifico argomento sono molte e differenziate: esse sono condotte in laboratori di ricerca pubblici e in imprese biotecnologiche dedicate (Agilent, Applera, Myriad Genetics, Gene Prot e altre).

Al di là di studi e ricerche volti ad allargare le conoscenze, e quindi l'efficacia delle possibili applicazioni, altre ricerche sono indirizzate a rendere più accessibili i dati e più facile la loro applicazione attraverso banche dati, la disponibilità commerciale di specifici reagenti e costrutti e infine, la presenza di imprese di ricerca per conto terzi, le cosiddette *enabling technologies supply companies*.

Profili di business e dati economici

L'applicazione delle tecnologie descritte si traduce in vantaggi in termini di tempo e dei rischi connessi alla ricerca e sviluppo di nuovi farmaci. Ricerche sull'argomento indicano riduzioni di costo di oltre il 30%, quando tutte le tecnologie siano applicate. È evidente che nella pratica, saran-

no scelte e applicate solo quelle adatte allo specifico caso, che porteranno comunque sostanziali vantaggi.

Al di là delle applicazioni in ambito accademico, sono operative tre tipologie di profili di business, corrispondenti ad altrettanti tipi di imprese:

- imprese farmaceutiche integrate che svolgono al loro interno tutta, o quasi, la ricerca di nuovi farmaci;
- imprese biotecnologiche che svolgono al loro interno la ricerca di nuovi farmaci dall'inizio fino a tutta la fase di ricerca preclinica e cercano successivamente la collaborazione in forme diverse con le aziende integrate;
- imprese specializzate nello sviluppo delle tecnologie che vendono le tecnologie stesse o le applicano per conto terzi.

6.2 Nuove tecnologie terapeutiche

INTERFERENZA DELL'RNA E CONTROLLO DELL'ESPRESSIONE GENICA

Descrizione

La tecnologia dell'interferenza dell'RNA (RNAi) consiste in un processo di inattivazione genica post-trascrizionale, altamente specifico, presente in piante e animali, innescato da RNA a doppia elica (dsRNA) omologo alla sequenza del DNA da sopprimere.

L'evidenza che la funzione biologica dell'RNA non fosse limitata a quella di semplice trasportatore di informazione dal DNA alle proteine, da cui il termine "messaggero", divenne chiara con l'identificazione della assoluta sproporzione tra il numero di geni e quello degli RNA trascritti, essendo il secondo di uno o più ordini di grandezza superiore.

È oggi accertato che la differenza fra i diversi organismi viventi, più che alla diversità genetica sia da attribuirsi a una differente modulazione dell'espressione genica; il fatto che il moscerino della frutta (*Drosophila*) e l'uomo abbiano un numero di geni non molto differente (20.000 e 21.000 rispettivamente), nonostante la grande distanza filogenetica tra i due, è spiegato appunto in termini di differente modulazione dell'espressione (cioè di funzionamento) degli stessi geni.

Tale controllo è alla base dei numerosissimi processi che presiedono alla proliferazione, differenziazione, apoptosi, senescenza e, se alterati, alla trasformazione neoplastica e ai fenomeni degenerativi.

L'interferenza dell'RNA è un processo specifico e complesso portato avanti dalla cellula. Quando questa identifica al suo interno una molecola di RNA a doppio filamento avvia il meccanismo della RNAi:

- attraverso un enzima chiamato *dicer*, la sequenza dell'RNA è tagliata in frammenti di lunghezza minore (circa 20 paia di basi);
- questi frammenti si legano a un complesso enzimatico, chiamato *risc*, il quale degrada il filamento *senso* e forma un complesso che espone quello *antisenso* e che è quindi in grado di riconoscere gli RNA messaggeri con la stessa sequenza i quali, ricordiamo, sono a singolo filamento e sono *senso*, e quindi complementari al filamento legato a *risc*;
- la *risc* è ora attiva: è in grado di scansire le molecole di mRNA presenti nella cellula e, mediante una sua componente enzimatica chiamata *argonauta*, degradare quelli che riconosce;
- il risultato finale è l'inibizione totale o parziale (modulazione) dell'espressione del gene che ha trascritto il messaggio.

In conclusione, e semplificando, è possibile controllare l'espressione di qualsiasi gene introdu-

cendo nella cellula dei frammenti di RNA a doppio filamento che abbiano una sequenza corrispondente a una sequenza tipica del gene che si vuole controllare.

Al di là del significato biologico ed evolutivo di questo meccanismo (controllo della differenziazione cellulare normale, e quindi della morfogenesi; di quella neoplastica, e quindi dei tumori; dell'apoptosi e della resistenza ad infezioni virali), da un punto di vista tecnologico, che è quello che interessa in questa sede, la tecnologia RNAi apre due nuovi orizzonti applicativi: il primo consiste nella ricerca per determinare la funzione di ciascun gene e il secondo mira all'identificazione di agenti e possibilità terapeutiche del tutto nuovi.

Applicazioni

La RNAi sta avendo un numero crescente di applicazioni nel campo dell'ingegneria genetica. In particolare essa viene utilizzata per silenziare selettivamente l'espressione di qualunque gene. Questi studi chiamati di *loss of function*, permettono di identificare il ruolo di un determinato gene attraverso il suo spegnimento (*knock-down*).

L'importanza di questo nuovo mezzo per identificare la funzione di ogni gene appare ovvia, se si pensa alle malattie genetiche e alla terapia genica o alla ipersensibilità agli effetti collaterali dei farmaci e dunque alla farmacogenomica o, ancora, a quante proteine possono essere importanti *target* per la ricerca di nuovi farmaci.

Allo stato attuale delle conoscenze, praticamente complete, sul genoma umano, la tecnologia RNAi è il mezzo più potente per trasformare la conoscenza di una struttura fondamentale in quella della sua funzione, cioè per passare dalla biologia alla fisiologia con tutte le implicazioni di carattere medico e terapeutico collegate.

Ma la tecnologia dell'RNAi, oltre a essere applicata per la ricerca, può costituire essa stessa un nuovo mezzo terapeutico. Infatti l'RNA a doppio filamento, che avvia l'interferenza, può essere utilizzato come farmaco capace di inibire, o comunque controllare, la produzione di proteine in qualche modo dannose e alla base di condizioni patologiche.

La prima applicazione a raggiungere i *trials* clinici è stata quella per il trattamento della degenerazione maculare, causata da una abnorme produzione di *Vascular endothelium growth factor* (VEGF), che è un mediatore dell'angiogenesi nella malattia oculare in questione. Altri possibili utilizzi di questi farmaci potrebbero essere quelli di repressori di geni essenziali di numerosi patogeni (batterici o, più importante, virali).

In un modello in topo, la RNAi si è dimostrata efficace nel silenziare geni di HIV. Sono in corso ricerche sulla possibilità di utilizzo della tecnologia per il trattamento di malattie degenerative e di alcuni tipi di tumore. Sull'argomento sono state depositate più di 2.000 domande di brevetto, una parte dei quali è già stata approvata e concessa.

Il grande interesse di questa tecnologia applicata a scopo terapeutico è da ricercarsi nella vastità di possibili applicazioni: qualsiasi gene può in teoria essere modulato; nella relativa semplicità di sintesi degli oligoribonucleotidi e nella avanzata, se non completa, conoscenza del genoma umano e di altre importanti specie. Esistono però alcune grosse difficoltà e problemi da affrontare e risolvere. L'RNAs è noto da decenni per la sua capacità di indurre la produzione di interferone con effetto tossico generalizzato: solo costrutti di dimensioni definite, situate attorno alle 20 paia di basi, ne sono prive.

Un secondo importante problema è rappresentato dalla particolare farmacocinetica delle molecole di RNA: esse non sono in grado come tali di attraversare le membrane biologiche e sono inoltre facilmente degradate dalle ribonucleasi, ciò che richiede la messa a punto di adatte tecniche di *delivery*, di protezione e di rilascio. Allo stato attuale questi sono i principali limiti all'applicazione.

Stato dell'arte

La tecnologia dell'interferenza dell'RNA fu scoperta nel 1998 da A. Fire e C. Mello (premi Nobel per la stessa scoperta nel 2006) e fatta oggetto negli anni successivi di vaste e intense ricerche sia a livello scientifico che applicativo.

Gli stessi Fire e Mello hanno brevettato l'invenzione, che però è restata disponibile a tutti (*se-minal patent*): varie imprese biotecnologiche (Alnylam, Sirna, Cytrx) hanno depositato e ottenuto brevetti. Quello forse più importante è stato ottenuto dal *Max Planck Institute*, ceduto in licenza alle imprese: esso riguarda la dimensione degli RNA ds, che dovrebbe essere compresa tra 19 e 25 nucleotidi. Allo stato attuale la tecnologia dell'RNAi è da considerarsi in fase emergente: solo come tecnica di ricerca essa può essere considerata, e non sempre, in fase di sviluppo.

Prospettive di sviluppo

Le prevedibili importantissime applicazioni della tecnologia dell'RNAi, sia come tecnica di ricerca e sviluppo che come nuovo settore di agenti terapeutici, ha stimolato una intensa ricerca che ha reso disponibili gli strumenti per un più facile e rapido progresso della stessa: librerie di siRNA (*small interfering RNA*), sistemi di espressione per clonare e produrre molto facilmente piccole quantità di RNAds, sistemi di *delivery* basati su vettori e sulla trasfezione di DNA o su adenovirus. Anche se nessun prodotto terapeutico ottenuto con la tecnologia in esame ha raggiunto il mercato, cosa d'altra parte ovvia considerati i tempi richiesti per questo, tenendo conto della massa di ricerche in corso, del coinvolgimento di parecchie imprese, dei brevetti depositati, dell'indotto attivo nella messa a punto e nella fornitura di strumenti specifici di ricerca, è più che legittimo prevedere nello spazio di 5 anni importanti sviluppi applicativi sia indiretti, come mezzo di ricerca e sviluppo farmaceutico, che diretti come prodotti ad attività terapeutica.

Profili di business e dati economici

Sono prevedibili alcune differenti tipologie di business:

- imprese, e laboratori, che studiano producono e vendono specifici reagenti e kit per la ricerca: esse sono già presenti e attive e aumenteranno molto rapidamente con l'aumentare delle conoscenze;
- imprese di ricerca che si dedicano alla ricerca di *target* ed eventualmente di *leads* da cedere a grandi imprese, che ricercano sviluppano e commercializzano farmaci;
- grandi o medie imprese del farmaco, che utilizzando in vario modo i risultati delle prime svilupperanno e porteranno sul mercato i prodotti.

Nell'ipotesi altamente probabile che le ricerche in corso abbiano successo, i risultati economici saranno molto buoni e saranno distribuiti su un ampia gamma di attori, dalla ricerca di base alle piccole e alle grandi imprese. I prodotti previsti possono collocarsi in vario modo, da piccoli prodotti o reagenti di nicchia fino a grandi prodotti da milioni di euro.

CELLULE STAMINALI E TERAPIA RIGENERATIVA

Descrizione

Le cellule staminali sono cellule non differenziate e con capacità proliferativa indefinita, che attraverso la loro progenie producono sia altre cellule staminali, sia cellule differenziate che costituiscono i vari tessuti e organi dell'organismo. I risultati della ricerca e alcune applicazioni già

in atto permettono di prevedere con ragionevole certezza, che le cellule staminali porteranno un sostanziale contributo alla medicina, permettendo in qualche modo di riparare tessuti e organi danneggiati e, su tempi più lunghi, addirittura di rigenerare parti di organi.

Le cellule dell'embrione nelle prime fasi dello sviluppo possiedono tutte le informazioni genetiche necessarie alla produzione dei molti tipi cellulari e relativi tessuti e organi che compongono l'intero individuo. Esse, in risposta a specifici stimoli, attraverso il cambiamento nel numero e nella tipologia dei geni che si esprimono in ogni fase dello sviluppo, si differenziano e si specializzano a formare le cellule somatiche dei vari tessuti e organi presenti nel corpo (osso, muscolo, fegato, nervi, ecc.). Si sottolinea che la differenziazione non cambia il genoma delle cellule, ma solo il suo *pattern* di espressione genica. Nei tessuti specializzati, accanto alle cellule funzionali permane un numero limitato di cellule staminali che provvedono a formare altre cellule differenziate in sostituzione di quelle che muoiono: esse sono più numerose negli organi con elevato ricambio.

In pratica quindi, e agli scopi di questa esposizione, esistono due tipi di cellule staminali: quelle *embrionali* e quelle *somatiche* o *adulte*. Le cellule staminali embrionali (ES) si ottengono da embrioni e sono caratterizzate dalla capacità di differenziarsi in ogni tipo di tessuto e organo, cioè sono *pluripotenti*. Le cellule staminali somatiche si trovano in molti organi, probabilmente in tutti, e originano essenzialmente solo le cellule del tessuto od organo dal quale provengono; esse sono *multipotenti*.

L'impiego delle cellule staminali somatiche a scopi applicativi soffre di due limitazioni: l'una numerica (sono poche e di difficile reperibilità) e l'altra fisiologica (dopo alcune divisioni cellulari in coltura perdono la loro multipotenzialità). Diversamente le cellule staminali embrionali possono essere mantenute in coltura per moltissimi cicli di divisione senza perdere la pluripotenzialità, ma la loro produzione incontra forti resistenze e limitazioni di natura etica. Risultati interessanti, per quanto preliminari, lasciano intravedere la possibilità di risolvere il problema della disponibilità di cellule staminali in grande quantità attraverso la riprogrammazione delle cellule somatiche (transdifferenziazione), mediante l'inserimento del nucleo di queste in un ovocita enucleato, oppure grazie all'impiego di sostanze simili a quelle presenti nel citoplasma della cellula uovo (citoplasto artificiale).

Applicazioni

Le cellule staminali trovano applicazioni sia nella ricerca scientifica di base che nello sviluppo di modelli cellulari di patologie specifiche del distretto anatomico dal quale provengono, ma soprattutto in interventi a fini terapeutici e rigenerativi di vari tessuti e organi. Per questa applicazione, che appare essere la più attraente, bisogna però ricordare che, per ovvie ragioni immunologiche, e quindi di rigetto, le cellule staminali più facilmente utilizzabili sono quelle provenienti dall'individuo da trattare.

Risultati positivi e consolidati sono stati ottenuti, grazie all'impiego di cellule staminali somatiche, nel trapianto di cellule ematopoietiche per la cura di varie forme di leucemia. Risultati clinici importanti sono stati ottenuti anche nel trattamento di patologie dell'epidermide, della cornea, dei vasi sanguigni e del tessuto scheletrico. Altri risultati, a livello molto preliminare, sono stati ottenuti con cellule staminali embrionali o somatiche nella terapia di Parkinson, infarto, diabete, Alzheimer e sclerosi amiotrofica. Possibilità intraviste, ma più remote, consistono nell'uso di cellule staminali per produrre *in vitro* fattori di crescita capaci di stimolare processi rigenerativi cellulari. Le cellule staminali sono anche molto importanti per la ricerca biomedica. Alcune aree di ricerca dove possono essere impiegate, sono quelle legate allo studio delle proprietà farmacologiche e tossicologiche di nuove molecole, effetti di anomalie cromosomiche sullo sviluppo embrionale, nuovi vettori utili per terapia genica, *in primis* per la terapia antitumorale, e altro ancora.

Stato dell'arte

La tecnologia delle cellule staminali si trova in fase “emergente”. L'idea di base, cioè la possibilità di riparare (in modo strutturale, o funzionale) tessuti e organi è stata ampiamente validata. Alcune applicazioni, come quella del trapianto del midollo per la rigenerazione di cellule ematopoietiche in casi di leucemia, sono ormai pratica comune. Alcuni ostacoli, come quelli dell'ottenimento di quantità sufficienti di staminali più plastiche, senza dover ricorrere agli embrioni, sono stati superati o stanno per esserlo.

Numerose imprese biotecnologiche, ospedali, centri di ricerca universitari, sono impegnati sull'argomento: ciò lascia prevedere già per i prossimi 5 anni importanti realizzazioni applicative e l'ingresso delle cellule staminali nella fase di “sviluppo”.

Prospettive di sviluppo

La dimostrata possibilità di trovare una nuova ed efficace terapia per malattie molto importanti, come quelle degenerative del sistema nervoso e quelle cardiovascolari, rappresenta il principale *driver* nello sviluppo delle cellule staminali. Un aspetto importante è la relativa semplicità di sperimentazione clinica e di utilizzazione terapeutica, che può essere in larga misura approvata dal comitato etico dell'ospedale, ciò che rappresenta un secondo importante fattore di stimolo.

È prevedibile che nei prossimi 5 anni lo sviluppo proceda con successo su due direttrici parallele: da una parte la messa a punto di tecniche efficienti, sicure e validate per l'amplificazione delle cellule staminali del paziente e dei relativi protocolli di utilizzazione terapeutica, dall'altra la ricerca di tecniche completamente nuove per produrre cellule staminali sia per scopi terapeutici che per ricerca biomedica. Queste previsioni sono basate su alcuni precisi stati di fatto già consolidati e su risultati validati di programmi di ricerca di base, che si riassumono entrambi a seguito.

Le cellule staminali trovano già importanti applicazioni terapeutiche (per esempio, nel trapianto del midollo in casi di leucemia), che ne confermano l'attività e l'utilizzabilità pratica.

I risultati di ricerche recenti hanno dimostrato che le cellule staminali sono praticamente presenti in tutti i tessuti e organi dell'organismo, anche in quelli come il cervello da sempre ritenuti (erroneamente) incapaci di ricambio cellulare.

Le cellule staminali adulte, caratteristiche dei differenti organi e tessuti e delle relative specializzazioni cellulari, possono trasformarsi reciprocamente l'una nell'altra; esse non hanno quindi perduto la loro plasticità.

Le cellule somatiche (non staminali), che costituiscono i vari tessuti e organi, possono essere trasformate in cellule staminali innestando il loro nucleo in oociti enucleati (transdifferenziazione), oppure mediante coltura in ambiente che per condizioni e composizione chimica mimi il citoplasma dell'oocita; le due tecniche determinano la riprogrammazione genetica delle cellule.

Le cellule staminali hanno già trovato applicazioni nella ricerca biomedica che, è facile prevedere, aumenteranno.

Gli sviluppi delle *nanotecnologie* rivolti alla messa a punto di materiali e metodologie per la crescita controllata di tessuti ingegnerizzati interagiscono in modo positivo con le possibili applicazioni delle cellule staminali. Particolare importanza a questo riguardo riveste la possibilità di creare basi biocompatibili per la crescita cellulare e per la rigenerazione di organi (*scaffold*) *in situ* o per impianti.

Tutto questo, anche se deve essere approfondito e sviluppato, lascia prevedere la possibilità concreta di produrre cellule staminali in quantità (senza fare ricorso agli embrioni): ciò renderà possibile un'ampia sperimentazione preclinica e clinica e sperabilmente l'utilizzazione delle cellule staminali in terapia. Nel frattempo ci sarà una intensa attività di ricerca e sviluppo prevalentemente gestita da imprese biotecnologiche dedicate.

Sembra dunque ragionevole prevedere che entro 5 anni le cellule staminali inizieranno a originare nuovi protocolli terapeutici e nuove iniziative imprenditoriali dedicate alla loro produzione e commercializzazione.

Profili di business e dati economici

Il mercato attuale e quello prevedibile a breve termine si limitano alla ricerca e a modelli cellulari; esso è di dimensioni modeste, ma comunque interessante per piccole imprese specializzate.

Lo sviluppo e la commercializzazione di cellule staminali troverà la sua collocazione preferenziale in imprese con vocazione biologica come, per esempio, quelle produttrici di antibiotici o vaccini o proteine terapeutiche. Le imprese biotecnologiche dedicate potranno trovare importanti opportunità di business, ma sarà indispensabile una stretta collaborazione tra imprese, ricerca di base (Università e Centri di ricerca) e ospedali.

È impossibile, e anche ozioso, definire le dimensioni economiche del business: se i risultati delle future sperimentazione confermeranno le previsioni, esse saranno comunque grandi e rapportabili alle dimensioni del mercato delle malattie per le quali l'applicazione terapeutica avrà successo.

6.3 Medicina preventiva

VACCINI

Descrizione

I vaccini ottenuti con le tecniche tradizionali impiegano generalmente i microorganismi patogeni uccisi o attenuati e l'immunizzazione con questi prodotti è accompagnata spesso da un'infezione in tono minore. Il patogeno a volte non ha perso del tutto la sua virulenza e può provocare la malattia contro la quale è impiegato; altri effetti collaterali possibili sono legati alla presenza di acidi nucleici o di altre sostanze estranee al vaccino e responsabili di forme allergiche, che possono arrivare fino allo shock anafilattico.

Tutti questi inconvenienti possono essere evitati applicando le tecniche dell'ingegneria genetica. Più precisamente, è possibile identificare la struttura antigenica più importante dell'agente infettivo, cioè quella proteina che evoca nell'ospite una risposta anticorpale di tipo protettivo, e relativo gene che la codifica ed esprime. Questo viene quindi clonato in un adatto ospite del tutto innocuo (un batterio, un lievito o anche un virus), che, coltivato in adatte condizioni, produce l'antigene che viene poi purificato o usato come tale senza inconvenienti. In questo modo si ottiene un vaccino efficace e sicuramente privo di potenziale patogenicità, con costi di produzione ridotti e senza problemi di sicurezza per i lavoratori che lo producono.

Applicazioni

Sono stati allestiti e sono entrati nella pratica medica circa 50 vaccini innovativi ottenuti applicando l'ingegneria genetica e altre tecniche a essa correlate. Essi sono attivi nelle infezioni virali, batteriche e in quelle provocate da parassiti, sia per uso umano che veterinario.

Un caso di particolare interesse è il vaccino contro l'epatite B dell'uomo, causato dal virus HBV, che è molto diffuso e, oltre a provocare la cirrosi epatica, è anche un agente cancerogeno per il fegato.

Il virus HBV contiene più antigeni ma uno di questi in particolare ha dimostrato di essere fortemente antigenico, l'HBsAg (*Hepatitis B surface Antigen*), noto comunemente come "antigene Australia", che potrebbe essere utilizzato come vaccino, ma si trova solo nel sangue di ammalati o di portatori sani e non è disponibile in quantità utili.

Il gene virale che codifica per l'antigene Australia è stato clonato e trasferito in un lievito (*Saccharomyces cerevisiae*, il comune lievito di birra) il quale, coltivato in fermentatore su un terreno colturale adatto e molto semplice, produce l'antigene nella sua forma completa che viene purificato e utilizzato come vaccino.

Stato dell'arte

Il settore dei vaccini, che poteva considerarsi maturo, si è fortemente innovato grazie alle applicazioni delle tecniche di ingegneria genetica: esse hanno destato grande interesse, cosicché molte imprese si sono impegnate in attività di ricerca e sviluppo sui nuovi vaccini. Altre importanti innovazioni, delle quali si dirà più avanti, sono state identificate e sono in corso di realizzazione pratica. In sostanza, grazie alle biotecnologie innovative, vi sono oggi più imprese coinvolte nel settore di quante ve ne siano mai state prima. Tenendo conto dei risultati prodotti e delle interessanti prospettive, la tecnologia dei vaccini deve essere considerata in fase di rapido sviluppo.

Prospettive di sviluppo

È prevedibile un ulteriore significativo sviluppo del settore verso nuove tecnologie più adatte alla specifica applicazione e patologia, le quali possono portare a vaccini privi di effetti collaterali e attivi contro patogeni finora non, o male, controllati. Fattori trainanti lo sviluppo del settore sono l'esigenza, non sempre completamente soddisfatta, di *safety* e la necessità di disporre di vaccini contro patogeni non ancora completamente controllati, come quelli per AIDS, epatite C, ceppi di *papilloma virus* e anche alcune forme tumorali. Un altro *driver* dello sviluppo del settore è la disponibilità di tecnologie avanzate di biologia molecolare molto efficienti, alcune delle quali si citano qui di seguito con relativi esempi.

Vaccini costituiti da ceppi virali vivi o attenuati e ingegnerizzati per l'espressione di proteine immunogene di più agenti patogeni, capaci quindi di proteggere contemporaneamente verso più malattie. Il virus più usato per questo scopo è il *Vaccinia virus*, che è un ceppo attenuato e innocuo del vaiolo.

Immunizzazione diretta con molecole di DNA ricombinante come tale. Il soggetto da immunizzare viene trattato inoculandogli per via intramuscolare dei plasmidi a DNA, incapaci di replicarsi autonomamente, ma che codificano ed esprimono nelle cellule muscolari l'antigene, ad esempio una proteina virale, in grado di indurre una risposta immunitaria efficace e duratura.

Detossificazione genetica. Un caso emblematico e interessante è quello della detossificazione della tossina di *Bordetella pertussis*, l'agente della pertosse. Il vaccino tradizionale antipertosse è costituita da cellule morte di *B. pertussis* che sono efficaci ma provocano effetti collaterali di un certo rilievo. L'antigene che evoca l'immunità è una tossina di natura proteica che è anche responsabile degli effetti collaterali. Dopo clonaggio del gene codificante per la tossina, questo è stato mutagenizzato finché se ne è trovata una forma che codificava per una tossina modificata la quale, pur mantenendo inalterata l'attività immunogenica, non mostrava più gli effetti tossici della tossina originale. Essa è stata la base per un vaccino efficace e sicuro.

Profilo di business e dati economici

La tipologia di impresa interessata al settore dei vaccini è caratterizzata da dimensioni medio grandi o grandi e ha normalmente un notevole grado di specializzazione. Al di là delle difficoltà tecnologiche produttive, la sperimentazione clinica dei vaccini è particolarmente gravosa e richiede *trials* molto ampi e tempi lunghi.

Piccole imprese con elevata competenza scientifica possono svolgere una parte importante di *discovery*, anche se difficilmente possono arrivare direttamente al mercato. La collaborazione tra

piccole imprese biotecnologiche e grandi imprese è, in queste caso - come in altri simili e tipici del settore farmaceutico - efficace ed auspicabile. Il fatturato europeo dei vaccini si colloca tra 2 e 2,5 miliardi di euro/anno.

DIAGNOSTICA: SONDE MOLECOLARI, PCR, DNA FINGERPRINTING, DNA MICROARRAYS, IMMUNODIAGNOSTICA

Le tecnologie biologiche avanzate applicate in diagnostica sono fondamentalmente di due tipi: quelle basate sugli acidi nucleici (*diagnostica molecolare*) e quelle che sfruttano la reazione antigene/anticorpo e sono quindi di tipo immunologico (*diagnostica immunologica*).

Descrizioni

Sonde molecolari - Le sonde molecolari sono basate sulla proprietà di sequenze nucleotidiche di riconoscere altre sequenze a esse complementari, di appaiarsi a esse secondo il noto schema di ibridazione degli acidi nucleici e servono a individuare e analizzare un determinato gene presente in un organismo. La sonda consiste in un frammento di DNA a singolo filamento, con la sequenza caratteristica di un determinato gene, al quale sia stato legato un marcatore (una sostanza radioattiva, un fluorocromo o altro), che ne permetta l'individuazione.

Le tecniche di utilizzazione delle sonde sono parecchie (*Southern blotting*, *Northern blotting*, *Dot blotting*, ecc.), ma essenzialmente consistono nell'estrazione del DNA genomico dall'organismo o, comunque, dal campione che si vuole esaminare per la presenza o l'assenza del gene di interesse, nel trattamento con la sonda che si lega alla sequenza corrispondente e nel successivo lavaggio che allontana la sonda non legata, mentre lascia le molecole ibridate, che si rivelano attraverso il marcatore e indicano con certezza la presenza del gene, o, comunque della frazione di DNA che si sta cercando.

Reazione a catena della polimerasi (PCR) - Un'altra importante tecnologia basata sull'identificazione del DNA, che interagisce con quella delle sonde, e che talvolta la sostituisce del tutto, è quella della PCR (*Polymerase chain reaction*). Essa permette di replicare e amplificare in vitro specifiche sequenze di DNA senza il trasferimento in cellule viventi. Dal 1987, anno in cui venne introdotta, le sue applicazioni sono state innumerevoli. I vantaggi che hanno resa la PCR tanto diffusa sono soprattutto di tipo tecnico: infatti, le altre tecniche di amplificazione richiedono l'utilizzo di vettori (plasmidi, virus) per trasferire il DNA da amplificare in cellule viventi (clonaggio), con tempi lunghi e costi elevati, mentre la PCR richiede soltanto la conoscenza delle sequenze adiacenti al frammento di DNA da amplificare e una DNA polimerasi resistente alle alte temperature. Essa consente di sintetizzare in poche ore oltre un milione di copie di un oligonucleotide rendendo così possibile l'identificazione di quantità estremamente piccole di DNA come quelle, per esempio di un capello o di poche molecole di un virus.

Impronta digitale del DNA (DNA fingerprinting) - La tecnica dell'impronta digitale del DNA o *fingerprinting* si basa sul polimorfismo dei frammenti di restrizione delle regioni ipervariabili del DNA (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Tali polimorfismi si evidenziano digerendo il DNA con enzimi di restrizione, separando i frammenti ottenuti per elettroforesi e facendoli reagire con sonde specifiche. I profili che si ottengono sono unici per ciascun individuo: è stato calcolato che la possibilità di incontrare lo stesso profilo in due soggetti umani che non siano gemelli, si aggira attorno a uno su dieci miliardi.

DNA microarrays - È certamente la tecnologia di indagine più avanzata nel settore biologico molecolare e consiste essenzialmente in una collezione di microscopiche sonde di DNA, ciascuna

delle quali rappresenta un singolo gene, attaccate a una superficie solida come vetro, plastica o chip silconici a formare uno schieramento definito (*array*). Su un solo *microarray* possono essere disposte in ordine conosciuto parecchie migliaia di sonde note anche come *probes* o *reporters*. Le determinazioni qualitative o quantitative con i *DNA microarrays* sono basate sulla specificità della ibridazione tra segmenti di acidi nucleici complementari e sulla loro rivelazione mediante marcatori fluorescenti. Oltre ai *DNA microarrays*, esistono e si stanno sempre più diffondendo i *protein microarrays* e gli *antibody microarrays*, che sono costituiti da un supporto solido sul quale sono schierati proteine purificate o anticorpi monoclonali, ognuno dei quali cattura la propria proteina *target* presente in una miscela complessa che sarà rivelata con marcatori fluorescenti.

Anticorpi monoclonali - A causa dell'estrema specificità del legame antigene-anticorpo, gli anticorpi monoclonali costituiscono uno strumento prezioso, che permette di identificare un gran numero di sostanze presenti in campioni e che abbiano, o naturalmente o perché opportunamente modificate, attività immunogena.

Le tecnologie più comuni basate su anticorpi sono il *Western blotting* e il metodo *ELISA*: il primo richiede una elettroforesi delle proteine e la successiva rivelazione della proteina che si cerca con un anticorpo monoclonale marcato, il secondo utilizza antigeni o anticorpi fissati a un substrato che rivelano anticorpi o antigeni rispettivamente attraverso una reazione colorimetrica determinata da un enzima legato a uno di essi.

Gli sviluppi in corso nelle *nanotecnologie* stanno avendo, e si prevede avranno sempre più nel prossimo futuro, importanti positivi effetti sulle tecnologie diagnostiche. I *microarray* sono già stati miniaturizzati e resi più efficienti in termini di numero di determinazioni. Nuovi *biochip* per la diagnosi precoce del tumore sono in fase avanzata di sviluppo. Altri sviluppi collegati alle nanotecnologie riguardano il settore dell'*imaging* attraverso biosensori o immagini nucleari con traccianti radioattivi.

Applicazioni

I due tipi di tecnologie descritte, diagnostica molecolare e immunodiagnostica, trovano applicazioni differenti determinate dalla loro stessa natura: è evidente infatti che le prime potranno essere applicate solo ove esistano acidi nucleici, mentre le seconde saranno limitate a sostanze immunogeniche o rese tali mediante legame con opportuni *carrier* proteici. Nel loro insieme, tuttavia, essi coprono la stragrande maggioranza delle esigenze diagnostiche analitiche nei settori della cura della salute umana e veterinaria, e in quelli dell'ambiente e agroalimentare: malattie infettive; malattie genetiche; rivelazione dei tumori; rivelazione di sostanze normali o patologiche o contaminanti nei liquidi biologici, nell'ambiente o nelle sostanze alimentari; identificazione di allergeni; ricerca e identificazione di *target* nelle malattie neoplastiche e degenerative; identificazione di persone.

La prima applicazione dei *DNA microarrays* è stato il monitoraggio dell'espressione genica attraverso il profilo degli RNA messaggeri formati e l'influenza su di essa esercitata da stati patologici o da condizioni differenti o, ancora, da fasi differenti di sviluppo o di evoluzione.

Successivamente il numero di applicazioni è aumentato con la possibilità di individuare rapidamente mediate sonde, PCR e *DNA microarrays*, parti di sequenze di RNA o DNA conosciute o predette e correlate a stati patologici in essere o in divenire, come l'analisi del genoma di soggetti con malattie genetiche, o con potenziali malattie familiari, quali diabete, malattie cardiovascolari o tumori familiari. Un'altra importante applicazione consiste nella identificazione dei cosiddetti tratti ipervariabili dei geni, ovvero quelle sequenze che variano da individuo a individuo nell'ambito della stessa specie e che sono responsabili, almeno in parte, della variabilità genetica e della suscettibilità a malattie, della sensibilità ai farmaci o ai loro effetti collaterali (farmacogenomica).

Questa particolare applicazione presenta anche notevole interesse in zootecnia, nella selezione di animali da riproduzione, in quanto è dimostrata una relazione tra tratti ipervariabili, loro mutazioni (*single nucleotide polymorphisms*) e caratteri economicamente importanti dell'animale.

I *protein microarrays* e gli *antibody microarrays* sono utilizzati nelle analisi biomediche per determinare la presenza e la quantità di proteine in campioni biologici. Essi permettono anche di identificare le interazioni proteina-proteina e i *target* di piccole molecole biologicamente attive.

Stato dell'arte

Le tecnologie diagnostiche a base biotecnologica hanno raggiunto una fase di sviluppo molto avanzato e in alcuni casi, come nelle tecnologie immunodiagnostiche, di maturità. Le applicazioni sottoforma di kit sono molto soddisfacenti e si misurano a centinaia. Fa eccezione la tecnologia dei *microarrays*, che si trova in una fase situata tra quella emergente e quella di sviluppo.

Prospettive di sviluppo

Le tecnologie diagnostiche sono in rapida evoluzione verso l'automazione e la semplificazione d'uso sempre più spinti: ciò che ne permetterà un impiego più diffuso e spostato verso il paziente consumatore (farmacie, *doctor office* o addirittura il paziente e, fuori dalla cura della salute umana, da allevatori, produttori e grandi distributori alimentari).

Un'altra tendenza collegata è lo spostamento, là ove possibile, dalla immunodiagnostica alla diagnostica molecolare più facilmente automatizzabile. Insieme con questo, e anche in conseguenza di questo, saranno sviluppate nei prossimi anni altre applicazioni oggi non esistenti, o per difficoltà non ancora superate, o per problemi di costi e di *target* commerciale. Esse saranno particolarmente numerose e importanti per la tecnologia dei *DNA microarrays*.

Uno dei principali *driver* delle tecnologie diagnostiche è la necessità sempre più avvertita di diagnosi precoci, che rendono più efficace e meno onerosa la terapia.

Profilo di business e aspetti economici

Il business dei kit diagnostici è di regola piuttosto frammentato e trovano posto in esso numerose piccole imprese tecnologicamente molto preparate. Il mercato attuale stimato per l'Italia per i kit diagnostici, quindi escluso l'eventuale servizio, è di oltre un miliardo €, ed è facilmente prevedibile che, con l'aumentare della medicina preventiva, esso aumenti significativamente nei prossimi 5 anni. La tecnologia dei *DNA microarrays* contribuirà più delle altre alla crescita del mercato.

6.4 Processi produttivi biotecnologici

PRODUZIONE BIOTECNOLOGICA DI ANTICORPI MONOCLONALI

Descrizione

Gli anticorpi che si ottengono inoculando gli antigeni nell'animale (sieri iperimmuni) e che sono usati come reagenti immunologici, creano seri problemi in quanto sono costituiti da una miscela di centinaia, o migliaia, di anticorpi che differiscono l'uno dall'altro per affinità e specificità e per la loro capacità di veicolare funzioni effettrici. Nell'animale (come anche nell'uomo), esistono moltissimi differenti tipi di cellule (linfociti), capaci di produrre altrettanti tipi di anticorpi in risposta agli stimoli antigenici e, siccome è accertato che ogni linfocita può produrre un solo tipo di anticorpo, per ottenere una preparazione di anticorpi tutti eguali bisogna utilizzare un solo linfocita e, ovviamente, la sua discendenza.

Questo può essere fatto fondendo il linfocita con una cellula di mieloma a formare una cellula ibrida (ibridoma) capace di crescere in vitro (il linfocita da solo non ne è capace, il mieloma sì) e di produrre l'anticorpo che, essendo prodotto da un solo clone, sarà "monoclonale" e costituito da molecole identiche. L'ibridoma può essere usato indefinitamente per produrre l'anticorpo coltivandolo su un adatto terreno sintetico o facendolo crescere come ascite nella cavità intraperitoneale del topo. Questa tecnologia di produzione è stata, e in parte lo è ancora, utilizzata per la produzione di piccole quantità di anticorpi per uso diagnostico. L'applicazione terapeutica degli stessi ha richiesto lo sviluppo di nuove tecnologie che permettono di ottenere anticorpi più adatti al particolare scopo e processi produttivi più efficienti.

Uno dei problemi per le applicazioni terapeutiche è che gli anticorpi monoclonali prodotti con gli ibridomi sono anticorpi di topo i quali, pur essendo molto simili a quelli umani, ne sono comunque abbastanza differenti da provocare reazioni immunitarie e infiammazioni sistemiche. Una soluzione potrebbe essere quella di generare anticorpi monoclonali umani direttamente dall'uomo impiegando linfociti umani stimolati; ciò è possibile pur con molte limitazioni connesse sia a ragioni etiche che a ovvie limitazioni tecniche, che di regola escludono la possibilità di immunizzare l'uomo contro antigeni di natura umana.

Il problema è stato risolto in modo soddisfacente con la tecnologia del DNA ricombinante, che permette di creare nuove molecole anticorpali nelle quali le regioni variabili, che sono quelle che riconoscono l'antigene, siano di topo, mentre le regioni costanti, siano umane. Il clonaggio e la ricombinazione dei geni anticorpali umani e murini produce in prima istanza una miscela (libreria) di anticorpi ibridi con piccole differenze in termini di amminoacidi, e quindi di attività e specificità, dalla quale si seleziona l'anticorpo con le caratteristiche volute con la tecnica del *phage display*, che permette di individuare, isolare e riprodurre l'anticorpo che meglio interagisce con il *target* e che sarà studiato come potenziale farmaco.

Questi anticorpi monoclonali che, a seconda della preponderanza della parte umana, sono noti come "chimerici" o "umanizzati", sono clonati ed espressi in cellule di mammifero o di lievito, che sono poi usate per la loro produzione. Le cellule di mammifero di regola utilizzate sono le cellule CHO (*Chinese Hamster Ovary cells*), una linea cellulare immortalizzata capace di crescere su terreni sintetici in varie condizioni colturali (in forma adesa, sulla parete di reattori o su microsfere (*microbeads*), su fibre cave (*hollow fibers*) o anche in sospensione).

I terreni sono di solito molto complessi a base di sali inorganici, vitamine, amminoacidi idrolizzati vegetali e, talvolta, antibiotici per evitare le contaminazioni batteriche. Altre cellule ospiti di uso comune sono rappresentate dal lievito (*Saccharomyces cerevisiae*), che è un microrganismo eucariote più maneggevole delle cellule CHO.

Poco utilizzato è invece *E. coli* perché, come tutti i procarioti, non è in grado di operare le modificazioni post-traduzionali, per es. glicosilazioni, che frequentemente sono essenziali per l'attività di molte proteine, compresi gli anticorpi.

Applicazioni

Gli anticorpi monoclonali trovano applicazioni in diagnostica, nei *drug delivery systems* e in terapia. Mentre per le prime due si rimanda ai relativi capitoli, a seguito si riportano le principali applicazioni terapeutiche.

Lo sviluppo degli anticorpi monoclonali in terapia è stato determinato essenzialmente:

- dalla scoperta e dalla disponibilità di numerosi *target* di patologie di natura proteica e quindi, di norma, capaci di evocare la produzione di anticorpi;
- dalla dimostrata possibilità di ottenere anticorpi monoclonali umanizzati, i quali a differenza di quelli murini, sono essenzialmente non immunogeni nell'uomo e hanno una emivita nel siero

di circa 21 giorni, uguale cioè a quella degli anticorpi nativi, contro le 30-40 ore degli anticorpi monoclonali murini;

- dalla disponibilità di tecnologie, basate su colture di cellule di mammifero o di lievito, che permettono, pur con costi elevati, di produrre quantità commerciali degli stessi anticorpi monoclonali.

A oggi i farmaci a base di anticorpi monoclonali in commercio sono una ventina; altri 120 sono in sperimentazione clinica. Le indicazioni principali sono nella cura dei tumori, delle malattie autoimmuni e dell'artrite reumatoide.

Stato dell'arte

La tecnologia degli anticorpi monoclonali, riferita sia alla loro creazione e selezione sia al processo produttivo industriale, è in fase di sviluppo. In considerazione della sua importanza, che è prevista aumentare, le tecnologie relative saranno ulteriormente sviluppate con particolare riferimento al miglioramento dei processi produttivi e all'aumento delle rese. Questi miglioramenti sono in fase emergente.

Prospettive di sviluppo

Gli anticorpi monoclonali sono stati per un decennio utilizzati soltanto nella diagnostica, la sola applicazione che poteva essere soddisfatta con le piccole quantità di prodotto ottenibile crescendo gli ibridomi nel topo sottoforma di ascite. La combinazione con la tecnologia del DNA ricombinante, lo sviluppo di tecnologie produttive più efficienti, l'ottenimento di anticorpi umanizzati e la possibilità di selezionare quelli più adatti con la tecnica del *phage display*, ne hanno decretato il successo in terapia. Lo sviluppo della genomica e della proteomica, teso a individuare nuovi *target* di patologie, in particolare *target* di natura proteica, è uno dei *driver* dello sviluppo degli anticorpi monoclonali. La possibilità, pur limitata, di produrre anticorpi monoclonali umani, già realizzata in alcuni prodotti, per esempio l'*Adalumimab* (Humira, per la cura dell'artrite reumatoide) è un altro importante *driver* dell'innovazione in questo campo.

Profilo di business e dati economici

Imprese biotecnologiche dedicate di ricerca possono svolgere la parte di ricerca e identificazione di nuovi monoclonali originali. Imprese analoghe possono produrre anticorpi monoclonali per terzi richiesti per svolgere la sperimentazione clinica da imprese che non hanno le *facilities* e le competenze necessarie. Naturalmente le imprese farmaceutiche integrate che fanno ricerca, non possono trascurare il campo degli anticorpi monoclonali, che è certamente uno dei più promettenti. La collaborazione con istituzioni di ricerca di base e con piccole imprese biotecnologiche di elevato livello scientifico sono praticamente indispensabili. Il fatturato mondiale dei farmaci a base di anticorpi monoclonali si stima in 8 miliardi di dollari; prodotti di punta come *Adalimumab* (Humira) e *Infliximab* (Remicade) fatturano più di 2 miliardi \$/a ciascuno.

PRODUZIONE DI PROTEINE RICOMBINANTI

Descrizione

L'insulina umana, ottenuta nel 1982, è stata la prima proteina terapeutica prodotta con la tecnologia del DNA ricombinante. Da allora, il numero di proteine prodotte e vendute a scopo terapeutico è cresciuto rapidamente e oggi esistono in commercio oltre 80 proteine utilizzate correntemente in terapia, con un mercato di circa 40 miliardi \$.

Tabella 2 - Criteri di selezione dell'organismo ospite produttore.

Parametri	<i>E. coli</i>	<i>Saccharomyces</i>	Cellule CHO
Produttività e semplicità	++++	+++	+
Modificazioni post-traduzionali	-	++	++++
Possibilità di contaminazione	+	+	++++
Fonte: G. Tonon: Convegno AIDIC, 2007			

I principali passaggi che permettono di ingegnerizzare un microrganismo, o una cellula di mammifero, per la produzione di proteine biologicamente attive, sono:

- l'isolamento o la sintesi del gene relativo;
- il suo inserimento in un plasmide vettore di espressione e il clonaggio di questo nell'organismo ospite;
- la coltura di questo in un adatto terreno colturale;
- l'estrazione e la purificazione del prodotto.

Le tecnologie relative sono descritte in dettaglio nei paragrafi sul *DNA ricombinante* e la *fermentazione*, ai quali si rimanda. Qui ci si sofferma solo su alcune importanti peculiarità dei processi produttivi delle proteine terapeutiche. Il processo utilizzato per produrre la prima proteina terapeutica, l'insulina umana, utilizzava come ospite e organismo produttore *E. coli* (*Escherichia coli*), senza dubbio il microrganismo più noto e più maneggevole e ancora largamente usato. L'attività di alcune proteine terapeutiche, però, è condizionata, in tutto o in parte, dalla presenza nella molecola di residui glucosidici che *E. coli* (come tutti gli altri organismi procarioti) non è capace di produrre perché non è corredato dell'apparato enzimatico necessario alle modificazioni post-traduzionali, che è invece presente e operante negli organismi eucarioti (come sono i mammiferi, incluso l'uomo). Il problema è stato risolto utilizzando come ospiti e organismi produttori cellule eucariote, cioè cellule di mammifero oppure cellule di lievito, che è un microrganismo eucariote. Le cellule di mammifero normalmente utilizzate sono le CHO (*Chinese Hamster Ovary cells*) e quelle di lievito il *Saccharomyces cerevisiae*. La scelta di quale ospite di espressione e produzione utilizzare è basata sulle esigenze specifiche di ciascun caso; alcuni criteri sono riportati nella Tabella 2. Il sistema di espressione usato può rendere inoltre più o meno semplice la fase di estrazione e purificazione del prodotto in quanto alcuni sistemi, ad esempio il lievito, possono secernere la maggior parte del prodotto nel mezzo di coltura, mentre altri sistemi, come le cellule di mammifero, oltre a dare normalmente produzioni meno elevate, richiedono una fase di lisi delle cellule perché tutta la proteina prodotta è endocellulare. Una tecnica di purificazione efficiente è la cromatografia di affinità, che permette il recupero della proteina sia dal mezzo di coltura che dal lisato cellulare. Essa impiega una resina inerte, alla quale sono stati legati anticorpi specifici che trattengono la proteina, separandola da tutti gli altri componenti della coltura.

Applicazioni

Le proteine terapeutiche finora sviluppate e commercializzate sono circa 80 e possono essere distinte in due gruppi: proteine di prima e di seconda generazione. Quelle di prima generazione sono proteine naturali, ormoni o fattori di crescita, da utilizzare come tali, sia per semplice terapia di sostituzione, come per esempio l'insulina nel diabete, l'ormone della crescita in patologie ipofisarie, il fattore VIII nell'emofilia, o in particolari stati fisiologici. Come esempio di questi ultimi, si ricorda l'eritropoietina, un fattore di crescita e differenziamento importante per la produzione

di eritrociti a partire da progenitori cellulari pluripotenti, e il fattore di stimolazione dei granulociti G-CSF (*Granulocyte-Colony-Stimulating Factor*). Le proteine ricombinanti di seconda generazione sono proteine modificate, principalmente mediante mutagenesi mirata del relativo gene (*site-directed mutagenesis*), in modo da avere caratteristiche vantaggiose rispetto alla proteina naturale di origine, in termini di facilità di produzione o di biodisponibilità, di attività biologica, di farmacocinetica o altro. Un esempio di queste proteine è il *reteplase*, un derivato dell'attivatore tissutale del plasminogeno (TPA), utilizzato come antitrombotico, nel quale sono stati eliminati tre frammenti cellulari (domini), con il risultato che la molecola può essere prodotta in *E. coli*, e quindi con costi inferiori, ha una emivita di 20 minuti contro i 5 minuti del TPA e può essere somministrata per iniezione anziché per infusione. Le proteine terapeutiche ricombinanti sono indicate per molte patologie, come per esempio emofilia, infarto del miocardio, prevenzione e cura di trombosi, diabete, deficienza di ormone della crescita, anemia, neutropenia, epatite, tumore.

Stato dell'arte

Le tecnologie di identificazione, sviluppo e produzione di proteine terapeutiche hanno superato da qualche anno la fase di emergenza e si trovano attualmente in una fase di intenso sviluppo.

Prospettive di sviluppo

Gli sviluppi prevedibili a tempi brevi sono principalmente i seguenti:

- identificazione di nuove proteine terapeutiche con differenti indicazioni; gli sviluppi della genomica e della proteomica sono funzionali anche a questo;
- proteine terapeutiche di fusione. Un esempio importante è costituito dall'Enbrel della Amgen, che è una proteina di fusione formata dalla ricombinazione del recettore di *Tumor Necrosis Factor* (TNF) con la regione Fc di immunoglobulina G. La componente TNF neutralizzerebbe la citochina proinfiammatoria TNF, mentre la regione immunoglobulinica ne faciliterebbe l'assorbimento da parte dei fagociti. Il farmaco ha una elevata attività contro l'artrite reumatoide;
- modificazioni della molecola proteica per migliorarne le caratteristiche. Per esempio il legame alla proteina di glicol polietilenico (PEG) ne aumenta la emivita nel siero e diminuisce i costi della terapia. Un altro interessante intervento sulla molecola proteica consiste nell'aumento del livello di glicosilazione che ne modifica le caratteristiche farmacocinetiche;
- i farmaci a base di proteine ricombinanti hanno quasi tutti prezzi e costi molto elevati. La ricerca di forme e di processi produttivi meno costosi è molto attiva (nuovi e più efficienti ospiti di espressione, processi produttivi ed estrattivi migliorati);
- sviluppo di prodotti biosimilari. I brevetti relativi ad alcuni importanti prodotti sono scaduti e di conseguenza la loro produzione e vendita è libera ciò che porterà inevitabilmente allo sviluppo di processi competitivi anche riguardo ai costi.

Profilo di business e dati economici

Sono identificabili tre tipologie di business:

- imprese biotecnologiche di ricerca con l'obiettivo di identificare nuove o migliorate proteine terapeutiche e di svilupparle in fase preclinica;
- imprese farmaceutiche integrate, capaci di realizzare l'intero processo di ricerca, industrializzazione, produzione e distribuzione del farmaco;
- imprese specializzate nella produzione di principi attivi con particolare interesse alla produzione di biosimilari.

Il valore del mercato mondiale delle proteine terapeutiche è di oltre 40 miliardi \$, mentre quello dei prodotti fuori dalla protezione brevettuale è di circa 13 miliardi \$.

FERMENTAZIONE

Descrizione

In biotecnologia, il termine fermentazione indica la tecnica di coltura di un microrganismo su un substrato nutritivo adatto, generalmente liquido, in condizioni definite e controllate, allo scopo di produrre grandi quantità del microrganismo stesso o dei suoi metaboliti.

La moderna tecnologia della fermentazione utilizza apparecchiature complesse: fermentatori muniti di strumentazione di controllo, sterilizzatori in continuo, programmi di processo gestiti da calcolatori.

Il processo comprende più fasi, dalla preparazione delle colture del microrganismo su provette di terreno agarizzato, a più fasi di sviluppo dello stesso microrganismo in recipienti di volume crescente (preinoculi, inoculi, ecc.) e finalmente la fase finale o “produttiva”, che utilizza fermentatori di capacità variabili da qualche metro cubo fino a 100 e più metri cubi.

I fattori che influiscono sulla resa della fermentazione sono molti, ma i più importanti sono le caratteristiche genetiche del microorganismo, modificabili mediante mutazioni indotte o interventi di ingegneria genetica, la composizione del terreno colturale e le condizioni imposte al processo, in modo particolare i trasferimenti di massa (miscelamento, aerazione, temperatura, pH). Un fatto molto importante è la disponibilità di modelli di studio del processo affidabili, semplici da gestire e scalabili: essi consistono essenzialmente in beute e fermentatori da laboratorio o pilota, che permettono di svolgere programmi complessi di sviluppo del processo realizzando rapidamente ed economicamente migliaia di prove.

Una caratteristica tipica di questi processi è che il loro principale componente è un organismo biologico, il microrganismo, che è possibile modificare profondamente indirizzandone il metabolismo verso la sintesi, anche in largo eccesso, della sostanza di interesse.

A titolo di esempio, si ricorda che i primi ceppi di *Penicillium* utilizzati per produrre la penicillina ne producevano qualche decina di mg per litro di coltura, mentre quelli attuali ne producono più di 50 grammi. Alla fine del processo fermentativo il prodotto desiderato deve essere separato dalla coltura e, se necessario, purificato.

A questo scopo si utilizzano tecniche differenti a seconda del caso: centrifugazioni, filtrazioni con filtri normali o con membrane, cromatografie su colonna, estrazioni con solventi.

Applicazioni

Le principali applicazioni della fermentazione sono le seguenti:

- produzione del microorganismo (lievito, batteri lattici, bioinsetticidi, biofertilizzanti, vaccini);
- produzione di metaboliti primari, cioè di sostanze che servono ai normali processi di crescita e riproduzione cellulare e in particolari condizioni sono prodotte in quantità molto eccedente il bisogno (acido citrico, acido succinico, amminoacidi, enzimi, vitamine, etanolo);
- produzione di metaboliti secondari, cioè di sostanze che non hanno una funzione diretta nel metabolismo cellulare, ma sono la conseguenza di cambiamenti importanti nelle condizioni ambientali, come per esempio l'esaurimento di alcune sostanze nutritive disponibili, la sopravvenienza di variazioni nella temperatura o nella disponibilità di acqua, che possono accadere in natura o essere appositamente provocate in laboratorio. Esempi di metaboliti secondari di grande interesse pratico sono gli antibiotici, gli alcaloidi, i coccidiostatici, gli antitumorali;
- produzione di proteine ricombinanti mediante microrganismi o linee cellulari, nei quali siano stati inseriti, con la tecnica del DNA ricombinante, i geni che codificano ed esprimono proteine di altri organismi, per esempio dell'uomo, e che, coltivate in adatte condizioni in fermentatore, producono quella proteina.

Stato dell'arte

La fermentazione, anche nella sua forma “avanzata” sviluppata principalmente negli anni '50 e '60, è una tecnologia matura, mentre le sue applicazioni sono in continua crescita e alcune di queste sono in una fase molto attiva di sviluppo. Nella grande maggioranza dei casi, la fermentazione è la tecnologia che deve essere applicata per trasformare i risultati di altre tecnologie in fatti produttivi. Esempi significativi sono rappresentati dalla produzione di proteine terapeutiche ricombinanti e da quella degli anticorpi monoclonali, che si realizzano mediante fermentazione, ma che richiedono importanti cambiamenti e innovazioni della tecnologia originale. Anche la produzione di etanolo, da utilizzarsi come vettore energetico, richiede importanti innovazioni del processo sia a livello del microrganismo che della modificazione enzimatica della materia prima di partenza. È quindi lecito affermare che la fermentazione è una tecnologia matura, nella quale tuttavia sono comprese parti importanti in fase di sviluppo.

Prospettive di sviluppo

Le prospettive di sviluppo a medio termine delle fermentazioni sono buone; è attraverso la fermentazione che la maggior parte dei prodotti che saranno ottenuti con le biotecnologie raggiungeranno il mercato. Il processo di innovazione in corso per i processi fermentativi e le relative apparecchiature permetterà di adeguarli alle relative esigenze: sviluppo dei microrganismi produttori mediante le moderne tecniche genetiche di clonaggio e amplificazione genica per renderli più produttivi e capaci di utilizzare substrati più convenienti; processi continui; riciclo delle cellule anche attraverso immobilizzazione; tecniche di estrazione e purificazione del prodotto più efficienti.

Altri importanti sviluppi già in corso, ma che si concretizzeranno ulteriormente nei prossimi anni, sono legati alla produzione fermentativa di proteine terapeutiche e di vaccini innovativi da DNA ricombinante ad alto valore aggiunto. Un fattore importante alla base del previsto elevato sviluppo dei processi fermentativi è l'impatto ambientale, qualitativamente molto meno pesante rispetto a quello associato ai processi chimici tradizionali, perché i reflui prodotti sono facilmente biodegradabili e le materie prime utilizzate sono rinnovabili.

Profilo di business e dati economici

Il business delle fermentazioni può trovare collocazione in varie tipologie dimensionali di imprese. Piccole imprese dotate solo di laboratori e di piccoli impianti pilota possono sviluppare processi per conto terzi; la disponibilità di impianti con fermentatori di qualche decina di metri cubi è sufficiente per permettere alcune produzioni molto specializzate, come per esempio enzimi per la ricerca o anche proteine terapeutiche; impianti con fermentatori di centinaia di metri cubi permettono di affrontare produzioni di antibiotici e sostanze analoghe. La produzione di biopolimeri o di vettori energetici richiede impianti di dimensioni ancora più grandi.

Le dimensioni economiche dell'industria delle fermentazioni sono ragguardevoli; il mercato europeo totale è stimabile nell'ordine di 20-25 miliardi di euro all'anno.

DNA RICOMBINANTE**Descrizione**

La tecnologia del DNA ricombinante, nota anche come ingegneria genetica o clonaggio ed espressione genica, è un insieme di tecniche che permettono di estrarre il DNA di un organismo, separare la parte di esso che interessa e inserirla, tal quale o previa modificazione, nel DNA di un altro organismo anche molto diverso, nel quale continuerà a svolgere la sua funzione di origine.

Sia come mezzo di indagine scientifica che come base di innumerevoli applicazioni pratiche, questa tecnologia, insieme con quella degli anticorpi monoclonali, ha segnato la nascita delle biotecnologie avanzate e rimane tuttora la più importante e più applicata delle tecniche di biologia molecolare.

I principali componenti di un sistema di clonaggio ed espressione genica sono:

- gli enzimi di restrizione, capaci di tagliare il DNA in punti precisi e definiti da specifiche sequenze di basi originando frammenti altrettanto definiti;
- i vettori, piccole molecole circolari di DNA capaci di ricevere frammenti di DNA, per esempio un gene, e trasferirlo in un organismo diverso da quello di provenienza;
- la DNA ligasi, che provvede alla saldatura dei frammenti nel vettore;
- l'organismo ospite, che riceve il vettore con il gene trasportato (chiamato anche gene passeggero) e fornisce le strutture per la sua replicazione e per l'espressione della proteina corrispondente.

L'uso di due tipi di strumenti, gli enzimi di restrizione e la DNA ligasi, permette quindi di tagliare la molecola di DNA in posizioni prestabilite e di saldare fra loro frammenti che, pur essendo diversi tra di loro, siano però stati ottenuti mediante taglio con lo stesso enzima: essi permettono di tagliare, spostare e riunire a programma il DNA, e quindi i geni.

Caratteristica minima di tutti i vettori utilizzati dal DNA ricombinante, è la capacità di replicarsi autonomamente all'interno della cellula e la presenza su di essi di un marcatore, di solito la resistenza a un antibiotico, che permetta l'individuazione e la selezione delle cellule che lo contengono.

Esistono vari tipi di vettori: i *vettori di clonaggio*, che hanno la struttura minima suddetta e servono per ottenere molte copie di un gene (amplificazione in vivo), che sarà poi recuperato e utilizzato per ricerca o a scopi diagnostici; i *vettori di espressione*, che possiedono anche le strutture necessarie per la trascrizione del gene (promotore) e determinano, nelle cellule nelle quali vengono trasferiti, la produzione della proteina codificata dal gene trasportato. Essi sono appunto utilizzati per indurre in un organismo la produzione di una proteina tipica di un altro organismo, per esempio, l'ormone della crescita umano in un batterio, o in un lievito.

Entrambi i vettori descritti operano all'interno della cellula ospite in modo autonomo, in parallelo e in convivenza con il genoma cellulare con il quale tuttavia non si confondono: la loro presenza e prevalenza vengono artificialmente imposte dalle condizioni colturali, per esempio, dalla presenza dell'antibiotico per il quale conferiscono resistenza e che avvantaggia le cellule che li contengono.

Altri vettori, al contrario, determinano l'integrazione del gene trasportato nel genoma della cellula ospite che di conseguenza cambia in modo permanente le sue caratteristiche genetiche: sono dei retrovirus e dei transposoni utilizzabili, per esempio, in terapia genica o per ottenere piante e animali transgenici.

Infine, per quanto riguarda gli ospiti nei quali trasferire il DNA dei vettori, quello più usato per la manipolazione del DNA (per esempio per allestire sonde molecolari) è sicuramente *E. coli* anche grazie alla disponibilità di numerosi vettori sintetici appositamente costruiti.

È anche possibile esprimere proteine in questo ospite, ma molto spesso si preferiscono sistemi di espressione, e quindi ospiti, eucarioti, quindi più simili agli organismi a cui questi prodotti sono destinati e che possono realizzare modificazioni biochimiche post-traduzionali come glicosilazioni, importanti per l'attività biologica e immunologica delle stesse proteine.

I lieviti, le cellule animali e quelle di insetto sono sistemi di espressione molto usati per la produzione biotecnologica di farmaci e vaccini per uso umano e veterinario.

Applicazioni

Le applicazioni del DNA ricombinante sono così tante da rendere certamente difficile e quasi inutile, elencarle tutte. Essenzialmente, la tecnologia del DNA ricombinante può essere utilizzata per due scopi:

- replicare e amplificare porzioni di DNA, in modo particolare un gene;
- produrre le proteine corrispondenti in modo programmato.

La prima possibilità genera applicazioni collegate alla genomica, alla produzione di sonde geniche, alla terapia genica, alla produzione di animali e di piante transgenici; la seconda ha consentito di ottenere vaccini, enzimi e decine di proteine terapeutiche ampiamente utilizzate in medicina (la prima è stata l'insulina umana, nel 1982, seguita da molte altre che hanno risolto importanti problemi terapeutici e generato fatturati considerevoli).

Il DNA ricombinante si è molto vantaggiosamente appaiato alle tecnologie degli anticorpi monoclonali e della fermentazione; nel primo caso clonando ed esprimendo i geni che codificano per la parte attiva dell'anticorpo, sostituendo in questo modo gli ibridomi con tecniche produttive molto più efficienti; nel secondo, contribuendo allo sviluppo dei vari processi attraverso clonazione e superespressione degli enzimi limitanti nel processo biosintetico, aumentando la produttività del processo.

Stato dell'arte

La tecnologia del clonaggio ed espressione genica, nei suoi aspetti generali è da considerarsi matura. Dagli anni '70 nei quali è stata introdotta, essa ha subito molte modificazioni e perfezionamenti, che l'hanno resa adatta a moltissime e differenti applicazioni. Tenendo conto invece delle applicazioni future attese, essa deve essere considerata una tecnologia ancora in fase di sviluppo in quanto qualsiasi avanzamento, sia scientifico che applicativo, nel settore delle scienze della vita dovrà applicare in un modo o nell'altro, in tutto o in parte, questa tecnologia ulteriormente adattata e perfezionata.

Prospettive di sviluppo

I fattori che determineranno l'ulteriore sviluppo del DNA ricombinante sono fondamentalmente l'esistenza di problemi irrisolti, soprattutto nel settore della cura della salute, alla soluzione dei quali può contribuire, e la necessità di ridurre i costi dei farmaci e quindi delle relative terapie. In particolare, la direzione dello sviluppo sarà verso la messa a punto di nuovi vaccini (AIDS, Epatite C, *Papilloma virus*, alcune forme tumorali); la produzione delle proteine terapeutiche note e la ricerca di nuove; la produzione a costi ridotti di anticorpi monoclonali; lo sviluppo di processi economicamente accettabili per la produzione di antibiotici attivi sui microrganismi patogeni resistenti e di altri metaboliti di interesse commerciale.

Il Dna ricombinante è la tecnica di avanguardia, nello studio delle proteine e del loro significato fisiologico, attraverso la tecnica di "perdita di funzione" (*knock-out*), acquisizione di funzione, o di studi con traccianti.

Profilo di business e dati economici

Il tipo di business collegato al DNA ricombinante è adatto a imprese grandi e piccole che operino in settori attinenti alla biologia e che abbiano buone competenze tecnico scientifiche. La messa a punto di un kit diagnostico relativamente semplice; lo sviluppo di un modello in vitro o in vivo di una malattia; l'identificazione di un *target* o di un antigene; lo sviluppo tecnologico di un processo fermentativo; la produzione di proteine e di anticorpi monoclonali; lo sviluppo di un vaccino, sono

alcuni esempi di tipi di business di differente complessità, che possono essere scelti in base alle capacità e ai programmi aziendali.

La pervasività di questa tecnologia nella ricerca biologica, nello sviluppo e nella produzione, rende difficile elaborare previsioni di fatturati, che sono invece legate al tipo di business: un kit diagnostico può fatturare alcune centinaia di migliaia di euro, mentre una proteina terapeutica ne fatturerà diversi milioni.

È comunque chiaro che, nel suo insieme, il DNA ricombinante rappresenta un potente fattore di innovazione e, di conseguenza, di competizione, del quale ogni impresa o istituzione di ricerca nel settore biologico non può più fare a meno.

