



Prodotti da processi biotecnologici

Metaboliti primari e secondari
ad uso farmaceutico

Indice

In copertina

Antibiotici

CCO Public Domain

Via Pixabay.com

Introduzione

Approfondimento: [osmosi inversa](#)

I vaccini tradizionali e ricombinanti

Anticorpi monoclonali

Gli interferoni

Gli ormoni - Produzione di ormoni proteici - Gli ormoni steroidei

La vitamina C

Gli antibiotici: penicilline, cefalosporine

Photo credits

Introduzione

I problemi con le proteine



BioTechnology@unimil.it

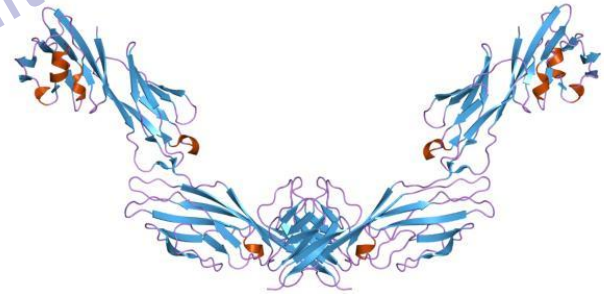
Introduzione

Le produzioni biotecnologiche per uso farmacologico umano comportano particolari attenzioni.

Ad esempio nella maggior parte dei casi sono di **natura proteica**. E quando si parla di proteine non basta solo individuare il gene di interesse insieme alle sequenze che ne regolano l'espressione e trasferire il tutto in un vettore. Bisogna individuare molto bene anche la cellula ospite. Infatti un conto è utilizzare una cellula procariote ed un conto è sfruttare una cellula eucariote di mammifero. I procarioti spesso hanno il difetto di produrre proteine degradate e sicuramente non glicosilate.

Introduzione

Invece la **glicosilazione**, vale a dire la presenza di catene laterali oligosaccaridiche, è una caratteristica fondamentale che influenza la solubilità, la stabilità e il tempo di dimezzamento. Infatti con questa trasformazione post-traduzionale la proteina raggiunge un ripiegamento perfetto e diventa più stabile.



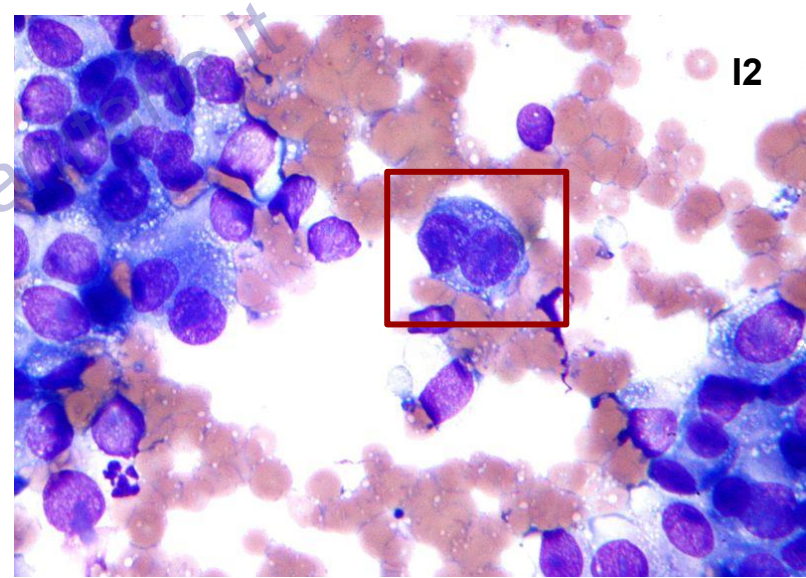
11

Struttura cristallina della glicoproteina CD4
presente sulla superficie cellulare dei linfociti T

Introduzione

La conseguenza di questo discorso è che la glicosilazione, non essendo codificata da geni, non può essere trasferita in strutture cellulari sprovviste dei sistemi necessari per la loro espressione.

In questo caso bisogna allora ricorrere a **cellule di mammifero** come nella produzione di interferone, degli anticorpi monoclonali o degli attivatori del plasminogeno. Da notare che in genere vengono scelte cellule tumorali per esempio derivate da melanoma.



Cellule di melanoma con le **cellule mostro a occhi sbarrati** (segnalata nel riquadro)

Introduzione

Altro problema è la **sterilità**. Bisogna considerare che questo tipo di prodotti è assunto dall'uomo a scopo preventivo o terapeutico e che quindi non deve essere contaminato. Ma le proteine sono termolabili e allora il problema riguarda la temperatura e i mezzi usati in genere perché anche le radiazioni ionizzanti o i gas non possono essere usati sul prodotto finale.

L'unica soluzione è lavorare in condizioni di sterilità. Quindi:

- le apparecchiature e gli strumenti vengono sterilizzati separatamente prima dell'uso (in autoclave, nelle stufe, con raggi γ o con trattamenti chimici)
- analoga sorte per gli **eccipienti**
- prima di essere trasferito nelle fiale il **prodotto viene microfiltrato** (diametro dei pori 0,2 micrometri)
- l'assemblaggio viene effettuato in camere sterili

Introduzione

Il problema della sterilità riguarda, ovviamente, anche il **terreno di coltura** che deve essere diverso da quello usato per lieviti o batteri se vengono manipolate le cellule di mammifero. Particolare attenzione deve essere posta in ogni caso ad eliminare:

- **proteine estranee** contro cui si scatenerrebbe una reazione immunitaria anche pericolosa
- **virus** che vivono e si moltiplicano all'interno delle cellule la cui fonte in genere è il siero che viene aggiunto come fonte di nutrienti
- **endotossine batteriche** che funzionano da pirogeni

Introduzione

Sui **pirogeni** vale la pena di spendere qualche parola in più. Riprendendo il discorso delle endotossine batteriche queste non sono altro che il lipide A dello strato esterno lipopolisaccaridico (LPS) dei batteri Gram-negativi.

Per eliminare le endotossine non bastano le temperature dell'autoclave ma sono necessarie quelle della stufa a secco, quindi 160°C.

Di conseguenza, per precauzione, le fiale che conterranno il prodotto finale vengono sterilizzate a 250°C per 30 minuti nelle stufe a secco.

Il problema dei pyrogeni però non si pone solo sulle fiale ma anche sugli eccipienti che vengono uniti al principio attivo nella fase di assemblaggio.

Se sono soluzioni vengono trattate per distillazione.

Per l'acqua che si utilizza per le iniezioni si usa il procedimento dell'osmosi inversa.

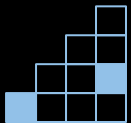


Introduzione

I problemi con le proteine

Approfondimento: osmosi inversa

BioTechnologieSalmarie.it

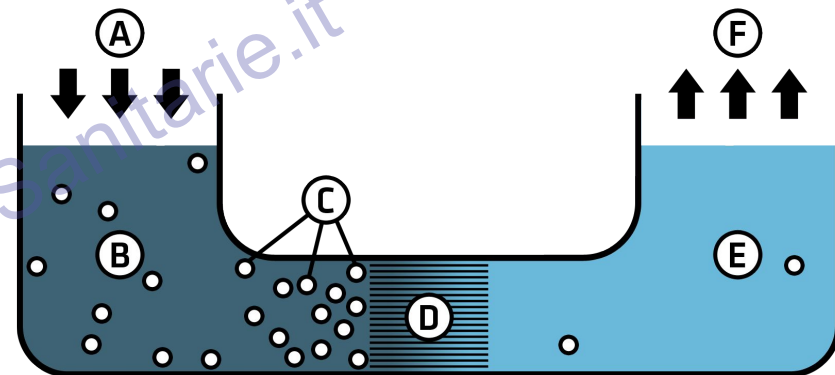


Introduzione: approfondimento

Osmosi inversa (RO - Reverse Osmosis)

L'osmosi inversa si applica quando si vuole ottenere un solvente puro, libero quindi da ioni, molecole e particelle più grosse.

L'obiettivo viene raggiunto con una membrana semipermeabile (**D** nel disegno) che trattiene il soluto da una parte (**C**).

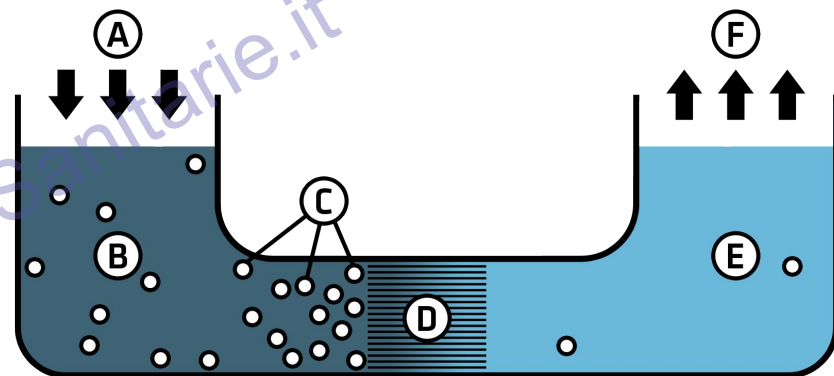


A reverse osmosis system
 A – Applied pressure
 B – Seawater in
 C – Particles
 D – Membrane
 E – Clean water out
 F – Distribution

Introduzione: approfondimento

Osmosi inversa (RO - Reverse Osmosis)

Il passaggio del solvente dalla soluzione più concentrata a quella meno concentrata viene forzato applicando alla soluzione più concentrata una pressione maggiore di quella osmotica.



A reverse osmosis system
A – Applied pressure
B – Seawater in
C – Particles
D – Membrane
E – Clean water out
F – Distribution

Introduzione

Per quanto riguarda il **processo** si usano bioreattori ad agitazione meccanica o air-lift con sistemi fed, in continuo o fed-batch.

La separazione del prodotto dalla massa cellulare e dal terreno di coltura, in altre parole la **purificazione (downstream)**, deve seguire degli standard rigidi perché ovviamente la purezza della sostanza ottenuta deve rientrare nei limiti imposti dagli enti che sono quelli che consentono l'immissione nel mercato i farmaci (FDA, per esempio) e nelle linee guida delle Good Manufacturing Practices (GMP).

Introduzione

La rigidità nei protocolli di purificazione è facilmente comprensibile.

Il prodotto biotecnologico non può contenere nessuna traccia di sostanze chimiche in grado di scatenare nei pazienti reazioni collaterali indesiderate o, anche peggio, casi di tossicità.

Negli esempi di prodotti farmacologici presentati nelle slide successive verranno presi in considerazione diversi metodi.

Introduzione

Eccipienti: quali sono e perché vengono utilizzati?

Parlando sempre di prodotti biotecnologici a base di proteine un altro problema delicato è garantire la loro conservazione tenuto conto che ci sono diversi aminoacidi che si ossidano facilmente.

Questo può essere superato:

- aggiungendo acido ascorbico che è un *antiossidante*
- *sostituendo l'ossigeno* nei contenitori con un gas inerte

Introduzione

Al di là della facilità di ossidazione c'è da evitare anche la possibile contaminazione di batteri e per questo si ricorre al classico acido p-idrossibenzoico o all'alcol benzilico.

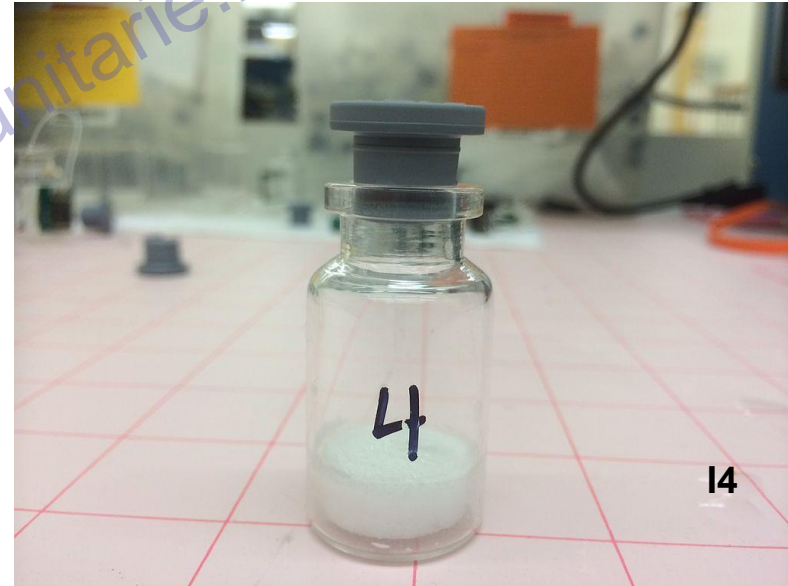
Dal pH dipendono la solubilità e la stabilità delle proteine e quindi si aggiungono sistemi tampone fosfato, citrato e acetato.

Ma la solubilità viene migliorata anche aggiungendo sodio dodecilsolfato che è un tensioattivo che previene i fenomeni di aggregazione.

Introduzione

Rimanendo sempre nel campo della conservazione un metodo molto utilizzato è la **liofilizzazione**. Questa consiste in tre fasi ben precise.

- **congelamento**: la temperatura viene portata rapidamente a -40°C per provocare la cristallizzazione dell'acqua libera
- **I essiccamento**: si abbassa la pressione e per sublimazione l'acqua cristallizzata viene allontanata
- **II essiccamento**: viene eliminata l'acqua legata e si porta la temperatura a 20°C .



I vaccini

Tradizionali e ricombinanti



BioTechnology@Sanitarie.it

I vaccini: storia

Al sistema immunitario è affidata la protezione contro l'attacco di microrganismi e altri agenti patogeni.

Una cosa è certa: il nostro sistema immunitario non dimentica l'incontro con un patogeno. Questo fatto era noto fin dall'antichità. Queste le parole lasciate da Tucidide nella sua descrizione della "peste di Atene" (460 a. C.)

"[...] coloro che si erano salvati dall'epidemia [...] per se stessi non avevano più nulla da temere: il contagio infatti non colpiva mai la stessa persona due volte, almeno non in forma così forte da essere mortale"

Non sappiamo quale fosse l'agente patogeno che decimò Atene in quell'occasione ma importante rimane la constatazione dello storico.



V1

Tucidide (460 -404 a.C.)

I vaccini: la variolazione

La stessa osservazione fu fatta nel tempo molte volte tanto è vero che cinesi, turchi e indiani furono i primi a mettere in atto la pratica della **variolazione**, cioè il tentativo di infettare le persone volutamente con forme più lievi della malattia. Gradualmente il metodo passò in Occidente. Vale la pena ricordare il coraggio (o l'incoscienza?) di Lady Mary Wortley Montagu, scrittrice e aristocratica inglese, nonché moglie dell'ambasciatore britannico a Costantinopoli. Di fronte all'ennesima epidemia di vaiolo decise di far variolizzare il figlio primogenito facendogli graffiare la cute e mettendo a contatto queste lesioni con pus prelevato dalle pustole affette da forme lievi di vaiolo. Il trattamento ebbe successo e la nobildonna si impegnò perché questa pratica si diffondesse.



Dipinto di Charles Jervas (1716)

I vaccini: Jenner

La storia ricorda però come prima vera vaccinazione meditata e studiata quella eseguita dal medico britannico Edward Jenner nel 1796. Lo scienziato aveva notato che le mungitrici a contatto con mucche affette da vaiolo bovino, non trasmissibile all'uomo, risultavano immuni dal vaiolo umano. Pertanto, ma anche con un certo rischio (al giorno d'oggi certe pratiche non sarebbero ammesse), prelevò del pus da animali affetti da vaiolo vaccino e lo inoculò in un bambino di 8 anni, figlio di contadini. Jenner ripetè l'inoculazione diverse volte con il risultato che il bambino non si ammalò mai di vaiolo umano.

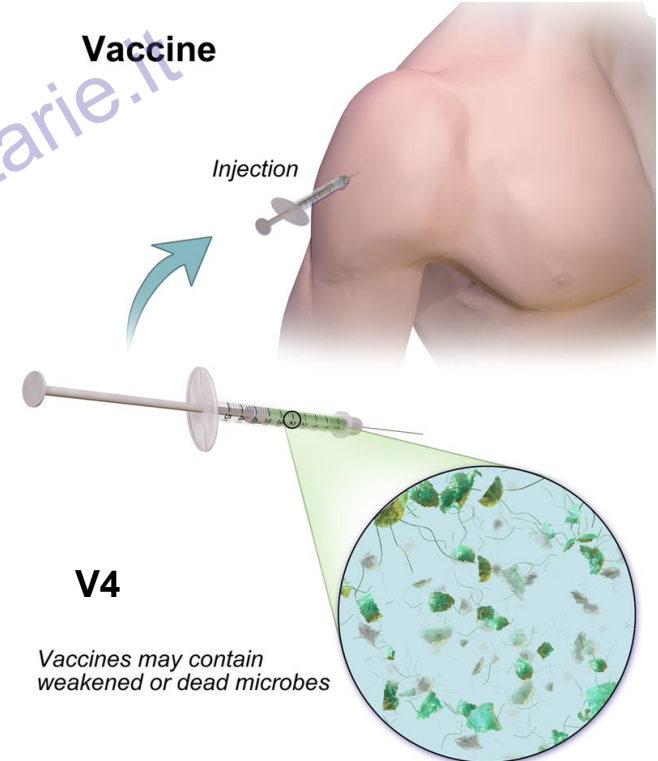


Edward Jenner inocula la prima dose di vaccino ad un bambino (James Phipps) di 8 anni (maggio 1796)

I vaccini: tradizionali

Ricordando questo episodio abbiamo anche scoperto l'etimologia della parola **vaccino** (deriva da vaiolo vaccino e ricorda il primo vaccino sperimentale). Gli studi successivi sono passati attraverso i grandi della storia della microbiologia e hanno portato alla produzione di tanti vaccini diversi suddivisi secondo il tipo di antigene prodotto. Quindi esistono vaccini:

- con microbi vivi e attenuati
- con microbi uccisi
- con polisaccaridi
- con anatossine



I vaccini: tradizionali

Vaccini con microbi vivi e attenuati.

Il microbo (virus o batterio) viene trattato in modo da fargli perdere la patogenicità ma di mantenere l'immunogenicità. In questo modo riesce a indurre una risposta immunitaria.

La perdita della patogenicità si ottiene con:

- *numerosi passaggi in vitro o in vivo* (cellule, tessuti, uova embrionate o animali vivi)
- *attraverso trattamenti chimici* come la nitrosoguanidina (mutageno).



V5

Somministrazione del vaccino antipolio di Sabin

I vaccini: tradizionali

Vaccini con microbi vivi e attenuati.

In questo modo si producono:

- il *vaccino di Sabin* contro la poliomielite
- i vaccini contro il *morbillo*, la *rosolia*, l'*influenza*, la *varicella*, la *tubercolosi*, la *febbre gialla*)

Tra gli effetti negativi la possibile riattivazione della patogenicità (nel caso dell'antipolio 1 volta su tre milioni).

Nella foto un operatore del CDC americano lavora sul virus dell'influenza in condizioni di biosicurezza.



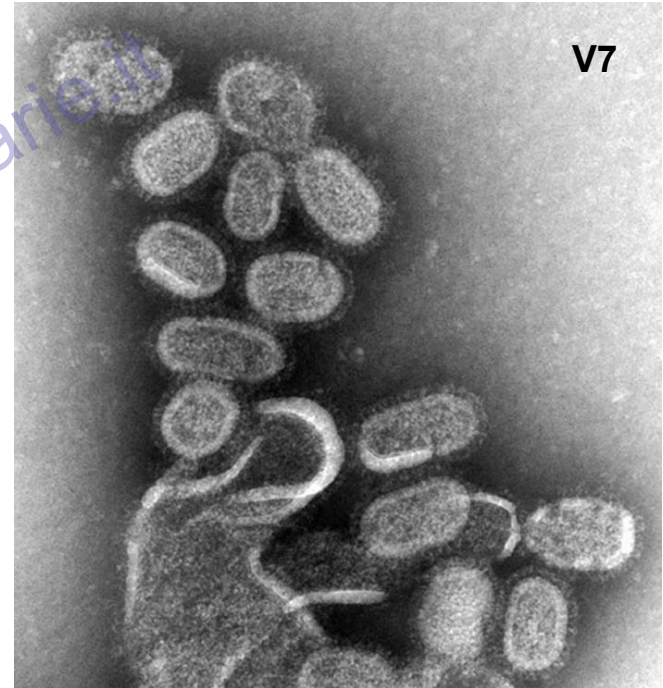
I vaccini: tradizionali

Vaccini con microbi vivi e attenuati.

Come esempio vediamo la produzione del **vaccino contro l'influenza**. L'influenza ogni anno provoca in Italia dai 5.000 ai 7.000 morti per complicanze (stime del Dipartimento di Malattie Infettive dell'Istituto Superiore di Sanità) e nel mondo 650.000 (dati OMS). Da qui l'esigenza di vaccinare soprattutto le fasce d'età più deboli.

Precisiamo prima alcuni dettagli sul virus.

Il virus è ad RNA, a filamento singolo negativo ma suddiviso in 7 o 8 pezzi, ed appartiene alla famiglia Orthomyxoviridae.



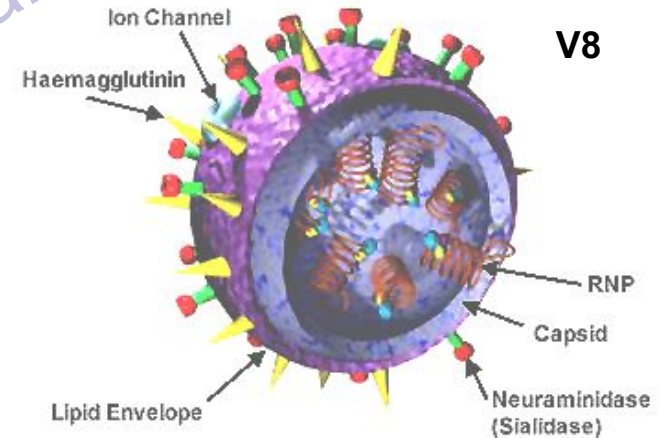
Virus dell'influenza al ME 100.000x

I vaccini: tradizionali

Vaccini con microbi vivi e attenuati.

La ricostruzione del virione evidenzia l'RNA (all'interno in spirali rosse, strettamente associate alle ribonucleoproteine RNP); mentre sulla superficie sono rappresentati due tipi di importanti proteine:

- le emoagglutinine (HA) responsabili dell'adesione del virus alle cellule da infettare
- le neuraminidasi (NA) che favoriscono la diffusione del virus dopo la replicazione evitando l'aggregazione delle particelle virali



I vaccini: tradizionali

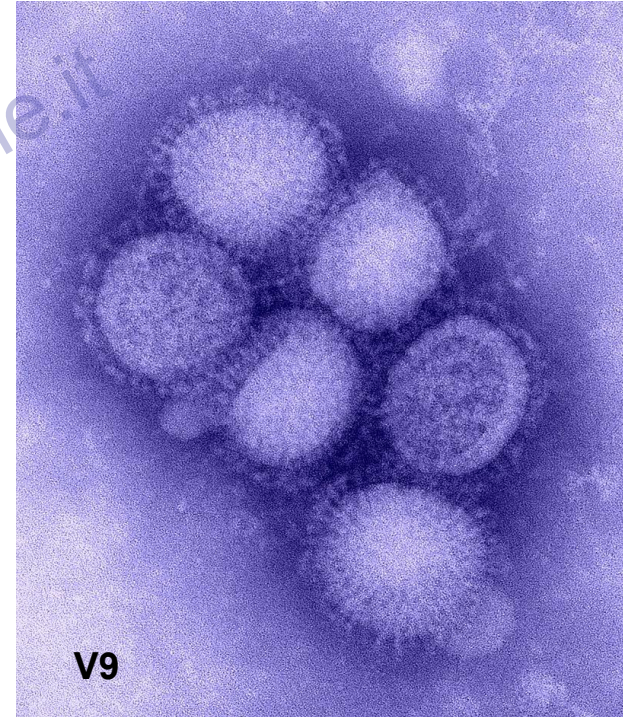
Vaccini con microbi vivi e attenuati.

La classificazione comprende 3 tipi di virus:

1. influenzavirus A
2. influenzavirus B
3. influenzavirus C

Solo i primi due presentano le proteine superficiali descritte nella slide precedente.

Le particelle virali, più o meno sferiche, hanno un diametro tra gli 80 e i 120 nm.



Influenzavirus H1N1

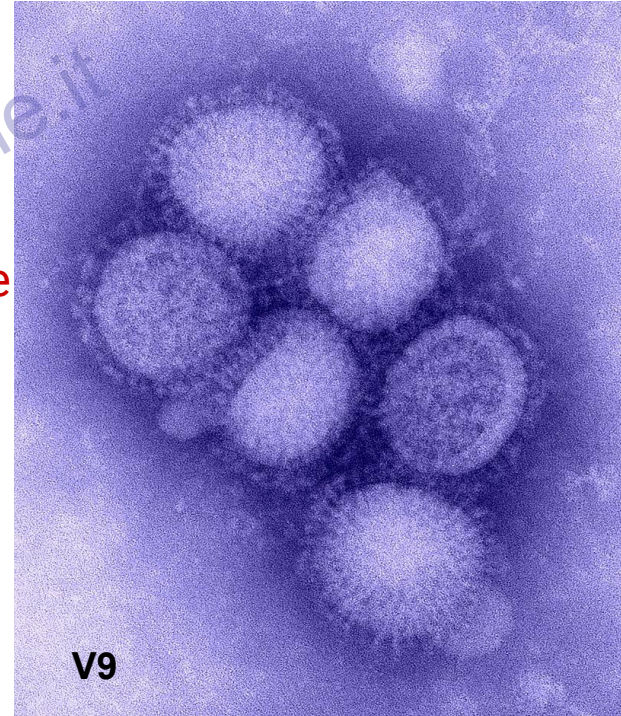
I vaccini: tradizionali

Vaccini con microbi vivi e attenuati.

L'immagine mostra un sierotipo particolare di influenzavirus A, l'H1N1 responsabile dell'epidemia di spagnola nel 1918 e della pandemia del 2009 nota come febbre suina.

Ogni tipo di virus è caratterizzato da diversi sierotipi sulla base degli anticorpi che vengono prodotti dal virus specifico.

Da ricordare ancora per il tipo A il sierotipo H2N2 che provocò l'asiatica nel 1957 e l'H3N2 responsabile della epidemia nota come Hong Kong (1968) e così via ...



Influenzavirus H1N1

I vaccini: tradizionali

Vaccini con microbi vivi e attenuati.

Mentre gli ospiti naturali dell'influenzavirus di tipo A sono gli uccelli selvatici e l'uomo e altri volatili lo sono solo occasionalmente, l'influenzavirus di tipo B infetta esclusivamente l'uomo. L'influenzavirus di tipo C è molto più raro.

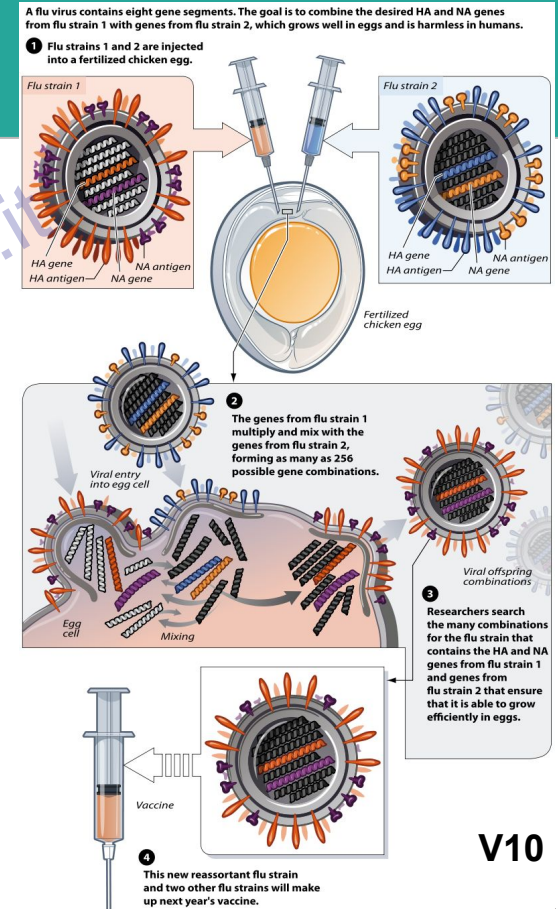
Questi elementi ci fanno capire la composizione del vaccino trivalente che fornisce copertura a tre sierotipi: un sierotipo *H1N1*, un sierotipo *H3N2* per il tipo A ed *un sierotipo* per il tipo B.

Vediamo ora come si produce il vaccino antinfluenzale.

I vaccini: tradizionali

Vaccini con microbi vivi e attenuati.

S prendono due ceppi diversi di virus influenzale e si trasferiscono i geni desiderati HA ed NA dei due ceppi in uova fertilizzate dove i virus si moltiplicano senza problemi. L'obiettivo è renderli non patogeni. Moltiplicandosi e mescolandosi i geni danno origine ad almeno 256 combinazioni. I ricercatori vanno alla scoperta del ceppo riassortito migliore che unito ad altri due ceppi formerà il vaccino nuovo dell'anno.



I vaccini: tradizionali

Vaccini con microbi uccisi

Appare evidente che questo tipo di vaccini non ha più il problema dei precedenti in quanto la morte del microrganismo elimina completamente la sua patogenicità.

Il suo problema però può essere l'opposto, vale a dire lo scarso potere immunogeno.

È quanto è successo con il vaccino *antipolio di Salk* che richiedeva più dosi. Più somministrazioni sono necessarie anche per il vaccino contro la *peste*, il *colera*, la *pertosse*, l'*epatite A* ...



Salk nel suo laboratorio con il vaccino antipolio (1955)

I vaccini: tradizionali

Vaccini con polisaccaridi

Alcuni batteri presentano antigeni polisaccaridici sulla parete cellulare che devono essere estratti e poi purificati e coniugati con una proteina per essere efficaci.

Il procedimento descritto porta alla produzione di un tipo di vaccino contro la *Neisseria meningitidis* di tipo C e lo *Streptococcus pneumoniae* (7 valente). Mentre il vaccino con il solo polisaccaride (vaccino nudo) viene prodotto e usato per la *N. meningitidis* dei gruppi A, Y, W135) e lo *S.pneumoniae* (23 valente).

Anatossine o tossoidi

Sono il risultato di trattamenti su esotossine batteriche e quindi di natura proteica. La detossificazione si ottiene in genere con il formolo (soluzione acquosa al 37% di formaldeide). Il metodo è legato alla produzione del vaccino contro *difterite* e *tetano*.

I vaccini: ricombinanti

Vaccini ricombinanti

La tecnologia del DNA ricombinante è entrata anche nella produzione di vaccini con tecniche molto diverse.

Uno dei primi vaccini prodotto è stato contro l'epatite B (HBV). Il metodo consiste nell'isolare un gene di superficie del virus (HBsAG), trasferirlo in un plasmide e clonarlo in cellule di lievito. Le cellule vengono fatte crescere e poi lisate per ottenere l'antigene sintetizzato. Il prodotto viene poi purificato.

Questo vaccino è efficace nel 95% dei casi ed evita non solo l'infezione perché visto il ruolo giocato dal virus nell'insorgenza di forme neoplastiche maligne del fegato può essere considerato a tutti gli effetti anche come un mezzo di prevenzione anticancro.

I vaccini: ricombinanti

Vaccini ricombinanti

Altro esempio che si può fare è il vaccino contro la pertosse (l'agente eziologico è *Bordetella pertussis*, nell'immagine). Il principio su cui si basa è trasformare il batterio stesso in un batterio ricombinante. Infatti la *Bordetella pertussis* produce una tossina formata da 5 subunità. Ognuna di esse è l'espressione di un gene. Quindi è stato sufficiente sostituire questi geni con forme modificate opportunamente per far produrre al batterio stesso una tossina ancora dotata di potere immunogeno ma senza patogenicità.



V12

I vaccini: ricombinanti

Vaccini ricombinanti

Non è detto che i vaccini ricombinanti siano privi di criticità. Nell'ultimo caso per esempio si potrebbero verificare delle mutazioni di ritorno che farebbero ripristinare la patogenicità originaria.

Altro metodo che si può attuare con queste tecnologie moderne è usare un microrganismo innocuo per l'organismo umano, in genere un virus e in particolare il virus del vaiolo, che può funzionare da vettore per geni particolari da far integrare nel genoma umano. Questi geni hanno il compito di far produrre anticorpi verso l'agente eziologico di una malattia infettiva.

Gli anticorpi monoclonali



BioTechnologiesSanitarie.it

Gli anticorpi monoclonali

Gli anticorpi hanno un ruolo molto importante nell'organismo umano. Sono molecole prodotte dai linfociti B, trasformati in plasmacellule, nella risposta immunitaria che si scatena contro strutture considerate non-self.

La loro azione è molto selettiva perché agiscono unicamente contro le molecole che ne hanno indotto la produzione, gli antigeni.

L'immunocomplesso che ne deriva, non stabile, richiama i meccanismi effettori che hanno l'incarico di distruggere l'antigene (attivazione del complemento, fagocitosi ...).

L'interesse della ricerca scientifica si è concentrata sulla reazione antigene-anticorpo perchè sono molteplici le applicazioni.

Nella prossima slide le principali funzioni degli **anticorpi monoclonali**.

Gli anticorpi monoclonali

Campo diagnostico

Si possono cercare in un siero gli anticorpi verso antigeni noti.

E viceversa, noti gli anticorpi, si possono individuare in campioni clinici gli antigeni legati a microbi responsabili di determinate infezioni.

Campo terapeutico

Gli anticorpi possono essere sfruttati come vettori specifici di farmaci. Per esempio verso cellule tumorali.

Immunoseparazione o individuazione di molecole o cellule in un substrato

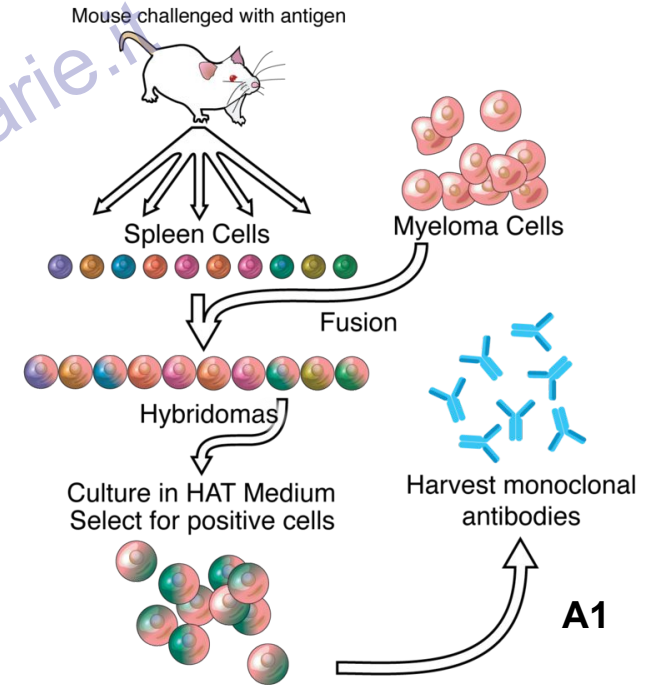
Il loro aiuto in questo campo è prezioso e non solo per l'individuazione perché in realtà assicurano anche la possibilità di isolarli ed estrarli.

Gli anticorpi monoclonali

Visti i notevoli campi di applicazione è chiaro che si è tentato di coltivare i linfociti B in grandi quantità per poter produrre da essi gli anticorpi specifici ma la cosa è estremamente difficile in quanto dopo poche generazioni i linfociti B muoiono.

Nel 1975 si è trovata la soluzione. Si sono usate due linee cellulari di topo che sono state fuse insieme generando un **ibridoma**:

- cellule tumorali di mieloma che hanno un potenziale di crescita infinito
- linfociti B della milza



Gli anticorpi monoclonali

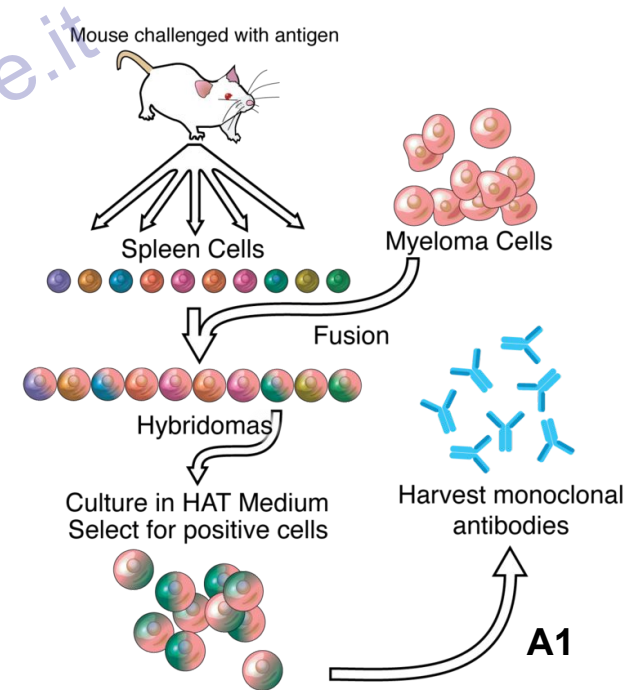
Come si procede?

Si induce nel topo un mieloma e contemporaneamente si introduce l'antigene o gli antigeni di cui si vogliono ottenere i relativi anticorpi.

Vengono poi prelevate le cellule del mieloma e i linfociti B dalla milza e poi si induce la loro fusione con formazione dell'ibridoma.

Per far fondere le cellule è necessario agire sulla selettività delle membrane e questo si ottiene con il polietilenglicole (PEG).

Si passa poi alla coltivazione degli ibridomi che deve avvenire a pH neutro, temperatura di 37°C e in terreno liquido.



Gli anticorpi monoclonali

In genere la loro coltivazione avviene dentro **bioreattori a fibre cave** (nella foto). Si tratta di un cilindro di materiale plastico attraversato nel senso della lunghezza da numerosissimi capillari cavi di pochi millimetri di diametro di materiale poroso. Le cellule sono disposte negli spazi tra i capillari. Il terreno invece viene fatto circolare nello spazio all'interno dei capillari. La permeabilità del materiale poroso consente ai nutrienti del terreno di passare dall'interno dei capillari allo spazio esterno e fornire così quanto necessario alle cellule in crescita.



A2

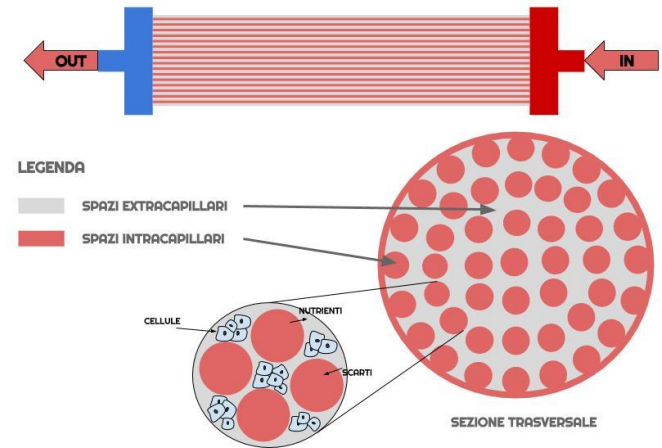
Gli anticorpi monoclonali

I cataboliti invece possono passare dagli spazi extracapillari verso l'interno dei capillari.

Si forma così un sistema a perfusione. Aria viene immessa all'interno delle fibre. Agendo sulla pressione del terreno di coltura liquido negli spazi tra i capillari si può agire sul movimento verso gli spazi esterni alle fibre o viceversa.

Se tutto procede bene la moltiplicazione cellulare è ottimale e la produzione di anticorpi dura per 30 giorni.

Bioreattore a fibre cave



Gli interferoni



BioTechnologiesSanitarie.it

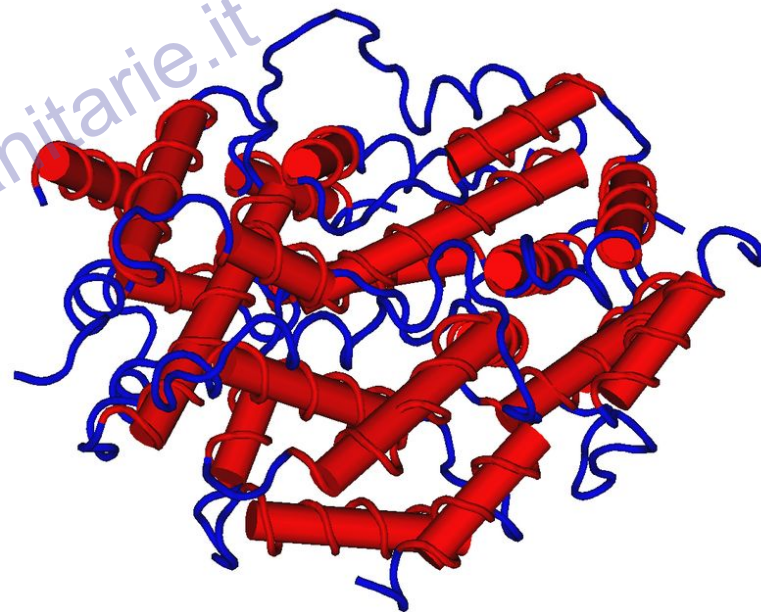
Gli interferoni

Gli **interferoni** (IFN) sono molecole proteiche (glicoproteine) ad alta specificità prodotte da globuli bianchi e cellule tissutali in risposta ad agenti patogeni come batteri, parassiti e virus oppure a cellule tumorali.

L'uomo ne produce di tre tipi:

- interferone alfa (da linfociti B e T)
- interferone beta (da fibroblasti)
- interferone gamma (da linfociti T)

Fanno parte di un gruppo di molecole dette citochine che attivano o inibiscono le risposte immunitarie.



Interferone gamma

IN1

Gli interferoni

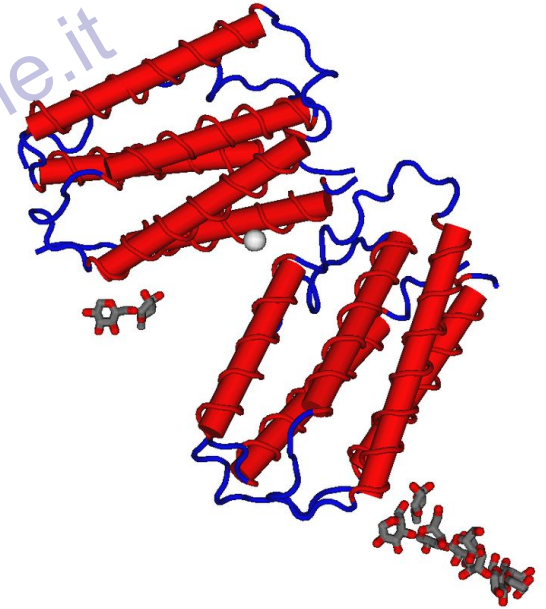
La loro **azione diretta contro i virus** si esplica:

- inibendo la replicazione del virus all'interno della cellula
- impedendo la sua diffusione in altre cellule
- rafforzando l'azione di cellule del sistema immunitario come i linfociti T e i macrofagi

Inoltre **inibisce la crescita delle cellule tumorali**.

In pratica l'interferone si lega alla membrana della cellula e in questo modo ne attiva la produzione di enzimi antivirali.

L'azione antivirale è appannaggio più che altro degli interferoni alfa e beta.



Interferone beta

IN2

Gli interferoni

Dal punto di vista industriale tutti e tre i tipi di interferoni si possono ottenere con la tecnologia del DNA ricombinante usando cellule di *Escherichia coli* in cui viene trasferito tramite vettore il gene umano. In questo modo però le proteine che si ottengono non sono glicosilate.

Ma esiste anche un'altra modalità per produrre attualmente il tipo beta: **sfruttare cellule eucariote di mammifero**.

Si parte da tessuti. Le cellule devono essere prima staccate le une dalle altre e poi messe in coltura in terreno liquido, in particolari contenitori come quelli nella fotografia (roux). In termostato, a 37°C, vengono fatte crescere, mantenendole sempre in agitazione per evitare che aderiscano alla superficie.



Contenitori per colture cellulari

Gli interferoni

Una volta adattate ai piccoli volumi si possono trasferire nei bioreattori STR, air-lift. Questi ultimi vengono preferiti per evitare che il movimento meccanico crei turbolenze negative per la corretta moltiplicazione cellulare.

Il terreno deve essere sterilizzato tramite filtrazione e deve contenere tutti i principi nutritivi. pH e temperatura devono essere monitorati in maniera continuativa.

Completato il processo l'interferone viene estratto dalle cellule (downstream) per filtrazione e poi separato dalla soluzione attraverso cromatografia con tecnica HPLC.

L'interferone viene poi sottoposto a liofilizzazione.



Interferone

IN4

Gli interferoni

Ecco un pezzo del macchinario usato nei laboratori del National Cancer Institute per produrre ed isolare interferone di origine umana. I vari tipi di interferone hanno un ampio uso nelle terapie di malattie virali e in oncologia.



IN5

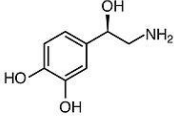
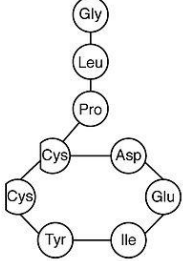
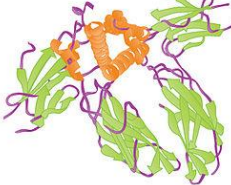
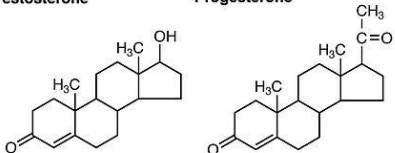
Gli ormoni



BioTechnologieSanitarie.it

Gli ormoni

Gli **ormoni** sono molecole addette alla comunicazione tra cellule, prodotti dagli organismi pluricellulari e nell'uomo da organi chiamati ghiandole endocrine. Servono più che altro a far comunicare organi distanti e regolano fisiologia e comportamento. Le ghiandole endocrine sono formate essenzialmente da cellule epiteliali il cui secreto viene immesso direttamente nel sangue. A seconda della loro struttura gli ormoni vengono distinti in: steroidi, peptidici (a corta catena aminoacidica) e proteici. A questi si aggiungono quelli formati da aminoacidi con il gruppo laterale che ha subito qualche modificazione (ad esempio la noradrenalina).

Hormone Class	Components	Example(s)
Amine Hormone	Amino acids with modified groups (e.g. norepinephrine's carboxyl group is replaced with a benzene ring)	<p>Norepinephrine</p> 
Peptide Hormone	Short chains of linked amino acids	<p>Oxytocin</p> 
Protein Hormone	Long chains of linked amino acids	<p>Human Growth Hormone</p> 
Steroid Hormones	Derived from the lipid cholesterol	<p>Testosterone Progesterone</p> 

OR1

Gli ormoni

Gli ormoni sono essenziali per il corretto funzionamento del corpo umano e la loro produzione è regolata da un delicato equilibrio che quando si rompe può provocare scompensi anche gravi.

Ben noto è il caso del diabete che è legato ad una scarsa o nulla produzione di insulina da parte del pancreas. Oppure può essere d'aiuto ricordare i problemi dovuti alla carenza di somatotropina (ormone della crescita). Spesso è necessario poter somministrare l'ormone mancante o deficitario ed è per questo che molte ricerche si sono concentrate sulla possibilità di produrre queste molecole ricorrendo alla tecnologia del DNA ricombinante. I primi successi si sono avuti con la somatostatina e subito dopo con l'insulina, entrambi proteici.





**Gli ormoni
di natura
proteica**

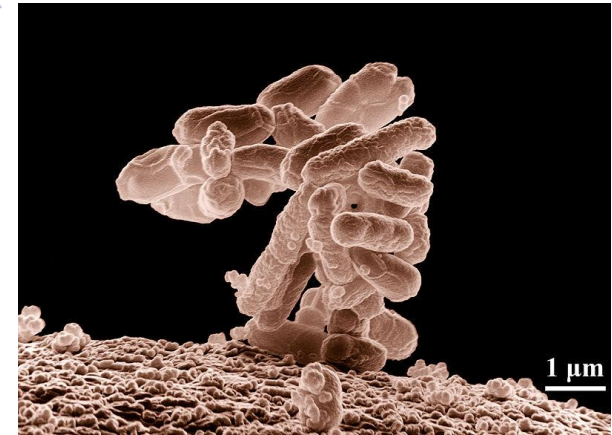
BiotechnologieSanitarie.it

Gli ormoni proteici

Gli **ormoni proteici** più comuni prodotti per via biotecnologica sono: la somatostatina, l'insulina, l'ormone della crescita e l'eritropoietina.

In genere viene trasferito il gene di interesse umano in un plasmide (pBR322) ospitato da *Escherichia coli* ma nel caso dell'eritropoietina si preferiscono cellule di criceto.

Il problema di usare *E. coli* è che bisogna aggiungere nel plasmide anche il gene per la β -galattosidasi altrimenti il batterio non riconosce come suo il prodotto che sta formando e potrebbe distruggerlo. Nel vettore si unisce quindi anche la regione di controllo (operone lac).



Escherichia coli
Ingrandimento 10.000x

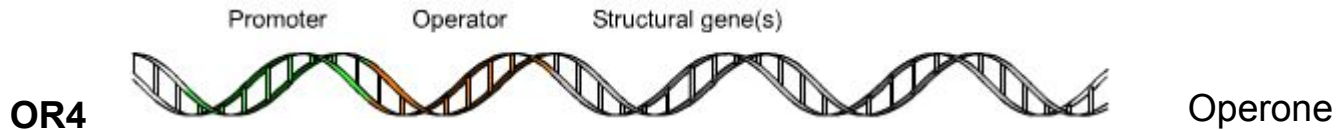
OR3

Gli ormoni proteici

Vale la pena ricordare brevemente che cosa è un operone e in particolare l'operone lac così si riesce a comprendere meglio la necessità di doverlo aggiungere al plasmide ingegnerizzato insieme al gene che codifica per la β -galattosidasi. L'**operone**, tipico dei procarioti, è un insieme di geni che vengono regolati in modo coordinato. Infatti, oltre a contenere i geni (geni strutturali) che codificano per determinati enzimi o proteine necessari al metabolismo della cellula procariote, ha sequenze specifiche del DNA che regolano l'espressione di questi geni.

In altre parole contiene:

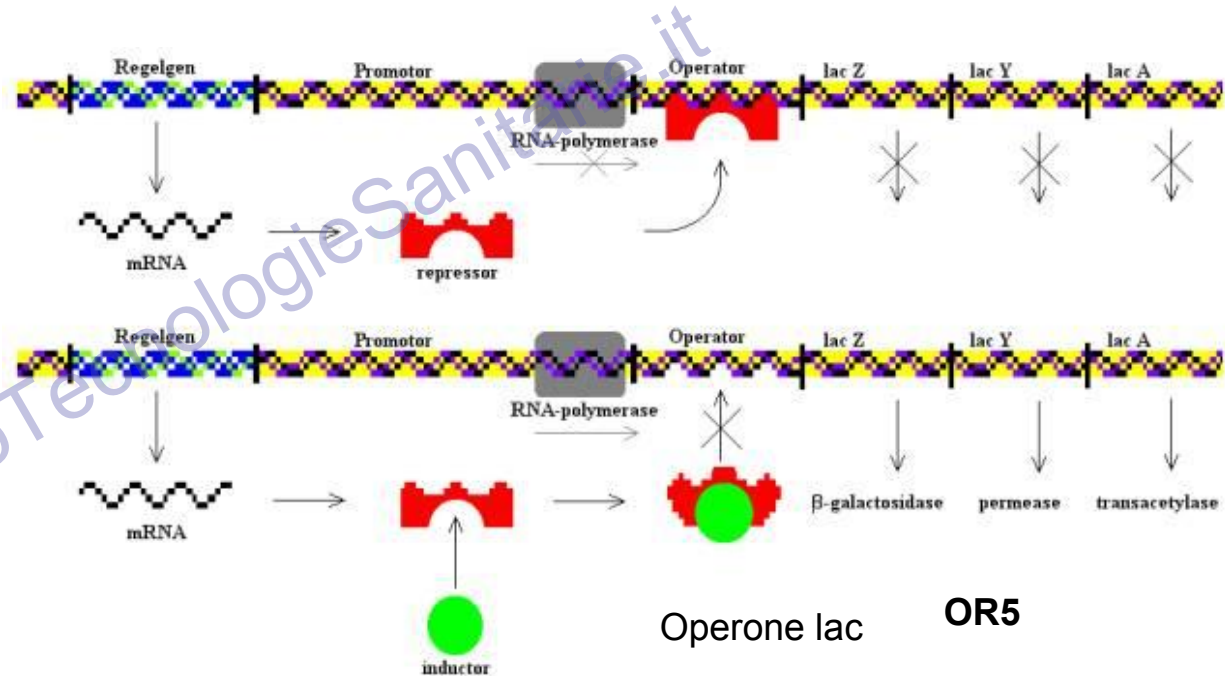
- i geni strutturali
- un promotore, situato a monte dei geni strutturali, che deve essere riconosciuto dalla RNA polimerasi per avviare la trascrizione nella sintesi proteica
- un operatore, una sequenza di DNA (a monte, a valle, anche lontano dal promotore) che *interagisce con una proteina attivatore o repressore* che prende questo nome a seconda che inneschi o inibisca l'espressione dei geni strutturali



Gli ormoni proteici

In particolare l'**operone lac** (operone lattosio), tipico di *Escherichia coli*, produce gli enzimi che sono necessari al batterio per utilizzare il lattosio al posto del glucosio.

E. coli, essendo molto diffuso, si è dovuto adattare a molti ambienti diversi. La sua fonte di carbonio può essere sia il glucosio che il lattosio anche se preferisce il glucosio. In mancanza dello zucchero esoso, utilizza il lattosio ma per farlo deve sintetizzare un pacchetto di enzimi: Z, Y ed A. Tutti e tre sono necessari.

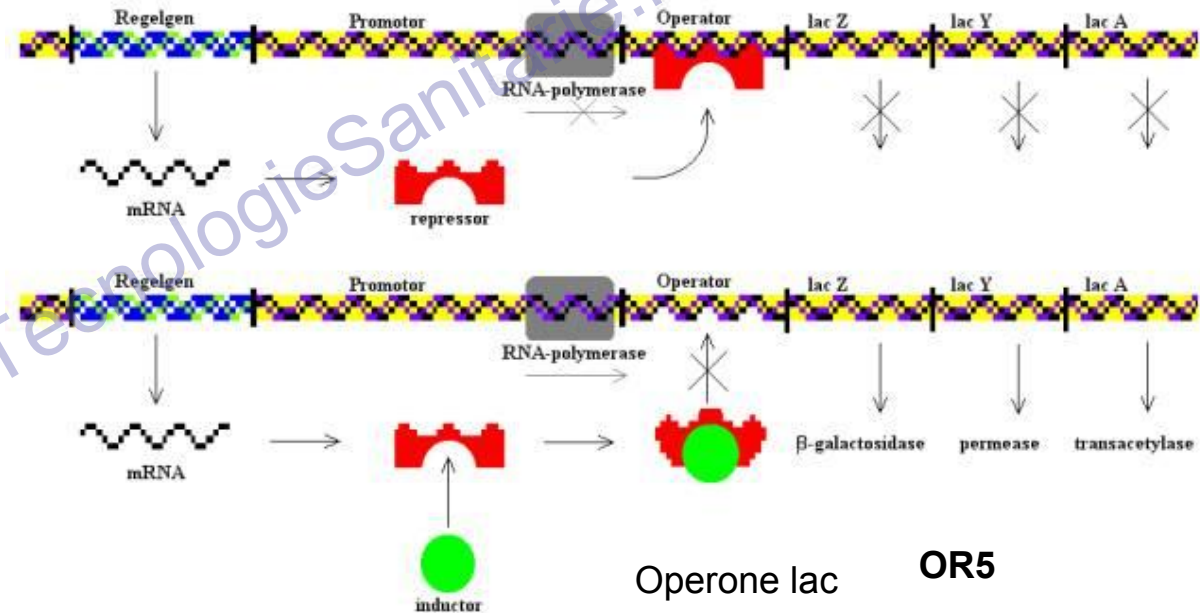


Gli ormoni proteici

Quando c'è il glucosio entra in funzione l'operatore che interagisce con la proteina repressore e quindi non avvia la sintesi degli enzimi che sarebbero coinvolti nella degradazione del lattosio.

In caso contrario l'operatore avvia la sintesi proteica. Il promotore viene riconosciuto dalla RNA polimerasi, inizia la trascrizione ...

A questo punto dovrebbe essere chiaro il perché della necessità di inserire nel plasmide che E. coli ospiterà oltre al gene umano che codifica per l'ormone proteico anche l'operone lac e il gene per la β -galattosidasi

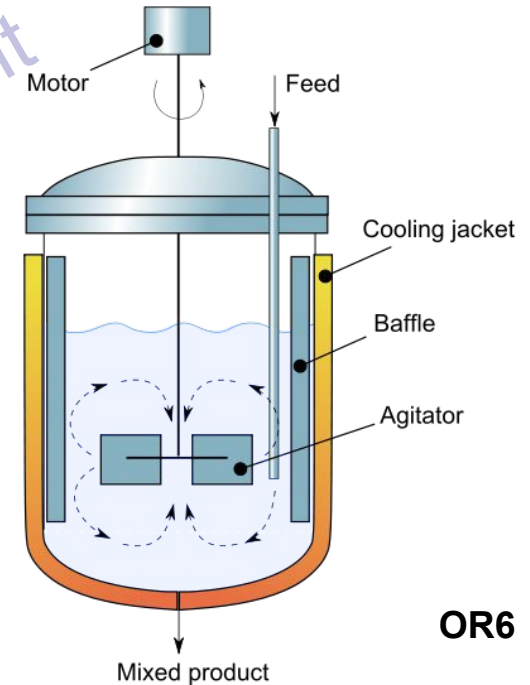


Gli ormoni proteici

Nella produzione biotecnologica industriale di ormoni proteici si usa in genere il **reattore STR** (stirred-tank reactor) con agitatore meccanico o del tipo air-lift.

La **separazione del prodotto** viene effettuata tramite la cromatografia HPLC su resina a scambio ionico. Segue poi un trattamento con solventi e la successiva concentrazione e cristallizzazione.

Da tenere presente che, se si usa E.coli che è un batterio Gram-negativo, bisogna pensare agli effetti pirogeni indotti da eventuali endotossine. Problema già affrontato nelle slide iniziali.

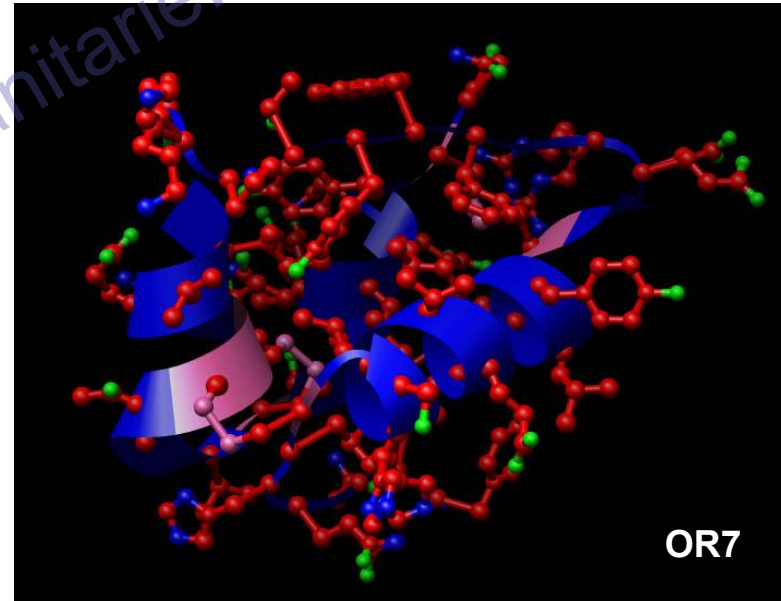


Reattore STR

OR6

Gli ormoni: insulina

L'**insulina** è stata tra i primi ormoni ottenuti con la tecnologia del DNA ricombinante (anni 70). Nel periodo precedente veniva estratta dal pancreas di bovini e suini nelle operazioni di macellazione con, a volte, gravi conseguenze sull'uomo come è facile immaginare. Viene prodotta dalle cellule beta delle isole di Langerhans del pancreas endocrino. Il suo compito principale è *regolare la concentrazione del glucosio ematico* inducendo per esempio il suo ingresso nelle cellule che lo utilizzano poi nei processi metabolici (principalmente epatociti e fibre muscolari). Inoltre ha un ruolo importante nella proteosintesi insieme ad altri ormoni tra cui il testosterone.



Gli ormoni: insulina

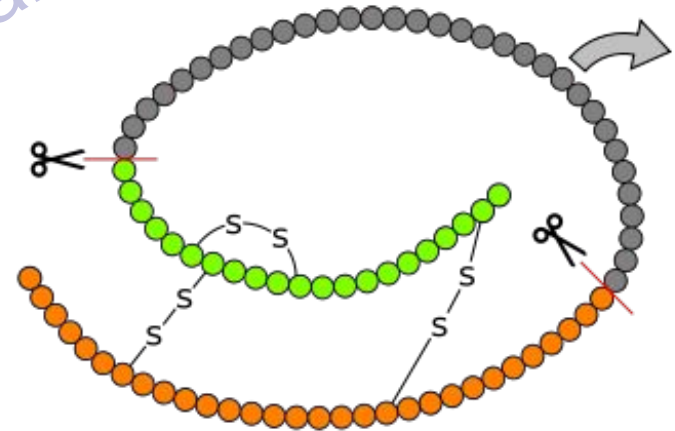
È formata da due catene polipeptidiche: A (21 aminoacidi) e B (30 aminoacidi) unite da due ponti disolfuro.

Nell'organismo umano l'insulina è prodotta come **pro-insulina**.

Nel disegno si nota l'unica catena proteica iniziale i cui colori evidenziano la presenza di una terza catena C che non ha alcun ruolo nella funzione dell'ormone ma che è necessaria per unire la A con la B dopo il taglio nelle tre componenti.

Il problema nella produzione biotecnologica è che E.coli non è in grado di tagliare la catena C e produrre l'insulina attiva.

Per ovviare a questo inconveniente si producono due cloni batterici. Uno in cui il plasmide ingegnerizzato ha l'informazione genetica per la catena A e l'altro per la catena B. Quindi si producono le due catene separatamente per poi unirle in un secondo tempo.



Pro-insulina

OR8

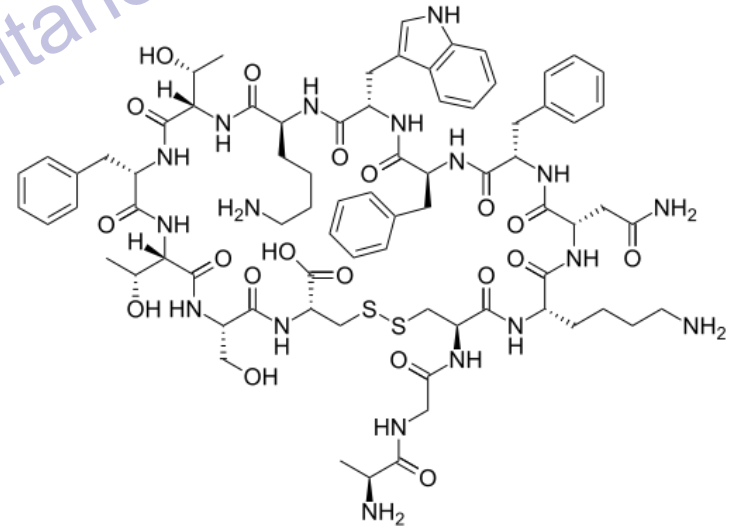
Gli ormoni: somatostatina

La **somatostatina** è prodotta dall'ipotalamo e regola, a sua volta, la produzione dell'insulina e dell'ormone della crescita.

È un peptide formato da soli 14 aminoacidi ed è stato isolato e sequenziato negli anni 70.

Praticamente può essere considerato il primo ormone prodotto con la tecnologia del DNA ricombinante e il processo industriale rispecchia tutte le fasi ampiamente descritte all'inizio di questa sezione.

Viene prodotto ed usato come farmaco in endocrinologia per curare adenomi ipofisari (acromegalia ...)

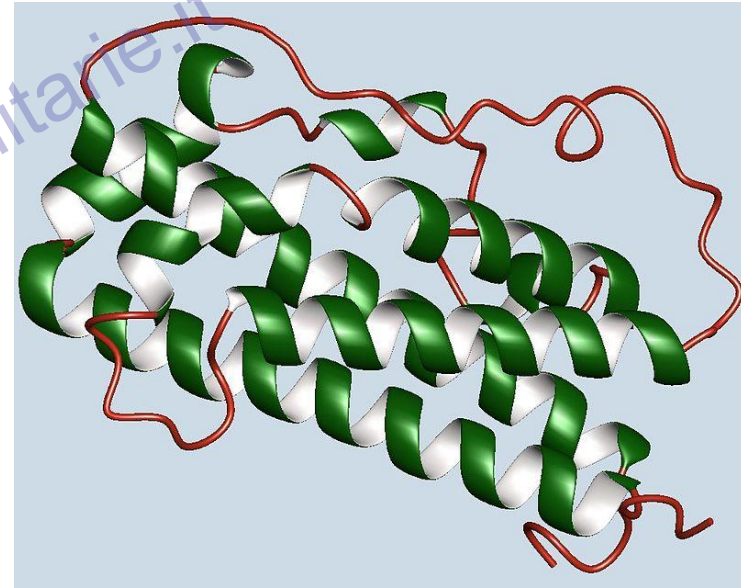


Somatostatina

OR9

Gli ormoni: somatotropina

La **somatotropina** (HGH = Human Growth Hormone) è prodotta dall'ipofisi anteriore (adenoipofisi) ed è formata da un peptide di 191 aminoacidi. Il ruolo fondamentale è stimolare la crescita corporea, soprattutto l'allungamento delle ossa lunghe. Se è carente si ha il *nanismo ipofisario*; se è iperprodotta si ha, al contrario, il *gigantismo*. In tutti e due i casi le proporzioni vengono rispettate. Cosa che non succede quando si verifica una sua produzione anomala in età post-puberale quando la sua concentrazione ematica dovrebbe gradualmente diminuire.



Somatotropina (HGH) OR10

Gli ormoni: somatotropina

La patologia associata è l'*acromegalia* che comporta un accrescimento osseo disarmonico a livello soprattutto di faccia ed estremità. Ricordo che questo argomento è stato già trattato nel sistema endocrino dove è stato evidenziato il ruolo del fattore IGF-1 secreto dal fegato in risposta all'ormone GHG.

L'ormone ha un'alta specie-specificità e quindi quando è necessario somministrarlo (tumori pituitari) non è possibile utilizzare quello prodotto dagli animali. Fino alla messa a punto della sua produzione con le biotecnologie si ricavava dai cadaveri con ovvie, possibili conseguenze negative.



Soggetto affetto da
acromegalia

OR11

Gli ormoni: somatotropina

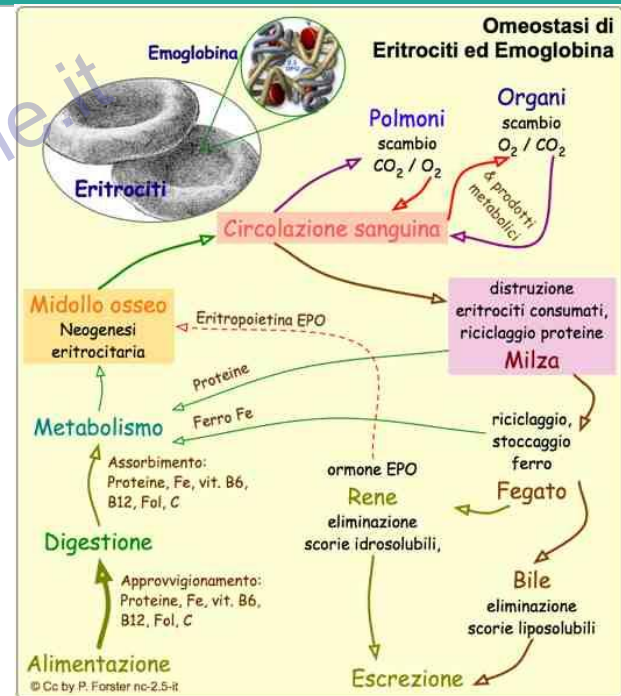
Questa è la sintesi degli step che portano alla sua produzione.

- l'mRNA viene estratto dall'ipofisi e sottoposto all'azione degli enzimi di restrizione per il taglio a livello del codone d'inizio e di stop;
- la molecola viene sottoposta all'azione dell'enzima trascrittasi inversa che è in grado di formare cDNA solo per l'87%
- il resto del DNA si ottiene per via chimica e poi unito al precedente grazie all'enzima ligasi
- il gene completo viene inserito nel plasmide pBR322 (insieme come sempre al gene per la β -galattosidasi e all'operone lac) e il plasmide trasferito in Escherichia coli
- inizia così la produzione dell'ormone che poi verrà separato dalla β -galattosidasi e da altre sostanze attraverso passaggi già menzionati nelle pagine introduttive

Gli ormoni: eritropoietina

L'**eritropoietina** regola l'eritropoiesi, cioè la produzione di globuli rossi a partire dai precursori presenti nel midollo osseo, ed è secreta dai reni e in minore misura dal cervello e dal fegato. È un ormone glicoproteico indicato anche con il nome di EPO.

La necessità della sua produzione deriva dalla possibilità di curare forme di anemia legate a malattie del sangue o renali oppure per accelerare la ripresa dopo la chemioterapia. Il disegno illustra molto bene tutto il processo di formazione e distruzione degli eritrociti e il ruolo dell'eritropoietina.

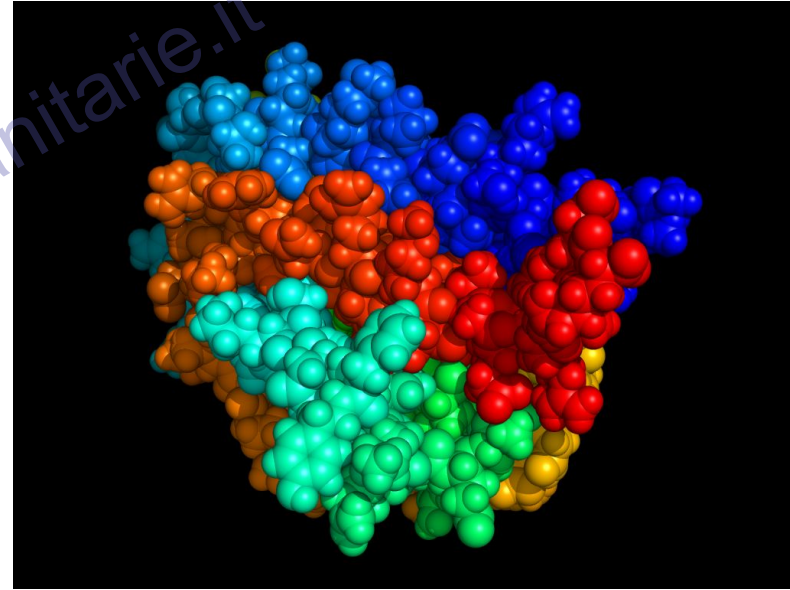


OR12
Omeostasi di eritrociti ed emoglobina

Gli ormoni: eritropoietina

Sono state messe a punto diverse tecniche che utilizzano sia microrganismi geneticamente modificati che cellule di ovaio di criceto. In ogni caso bisogna conoscere la sequenza di nucleotidi cioè il gene che codifica per l'ormone.

- Si estrae l'EPO dal rene e si sequenziano gli aminoacidi; da qui si può sintetizzare il corrispondente DNA che viene marcato per essere utilizzato come sonda (probe);
- Il DNA umano viene frammentato e i frammenti inseriti in vettori da inserire in singoli cloni batterici;



Eritropoietina

OR13

Gli ormoni: eritropoietina

- la sonda viene inserita nelle colture per identificare quali cellule contengono il frammento di interesse;
- a questo punto le cellule identificate vengono fatte crescere per amplificare il gene di interesse; una volta estratto dalle cellule batteriche viene trasformato in una seconda sonda;
- la seconda sonda viene messa a contatto con cellule renali umane perché tutto il procedimento precedente è rivolto ad individuare l'mRNA da cui ricavare il cDNA;
- il cDNA finalmente trasferito in cellule batteriche attraverso un plasmide viene clonato ma questa volta le cellule servono solo alla sua amplificazione; infatti la produzione è effettuata in un passaggio successivo da cellule di ovaio di criceto;
- lo step finale è la separazione e purificazione con i soliti metodi.

Gli ormoni: eritropoietina

L'EPO purtroppo viene utilizzato come sostanza dopante in tutti quegli sport che richiedono un'attività fisica intensa e prolungata (corsa, ciclismo ...). L'abitudine si è consolidata fin dalla fine degli anni 80, nonostante i pericoli legati ad un'eccessiva assunzione, anche perché l'ormone è facilmente iniettabile sottocute e rimane attivo per diverse settimane.

Come è facile assumerlo è altrettanto facile documentarne la presenza con il test dell'ematocrito (volume percentuale degli eritrociti nel sangue).



Ematocrito

Gli ormoni: eritropoietina

Questi sono i valori normali dell'ematokrito:

- uomo 40 -54%
- donna 37 - 47%

Ma bisogna ricordare anche che controlli antidoping ematici, che attualmente vengono fatti con tecniche diverse e in modo del tutto casuale, sono molto delicati. Basta una conservazione dei campioni sbagliata per inficiare il tutto.



Ematokrito



Gli ormoni steroidi

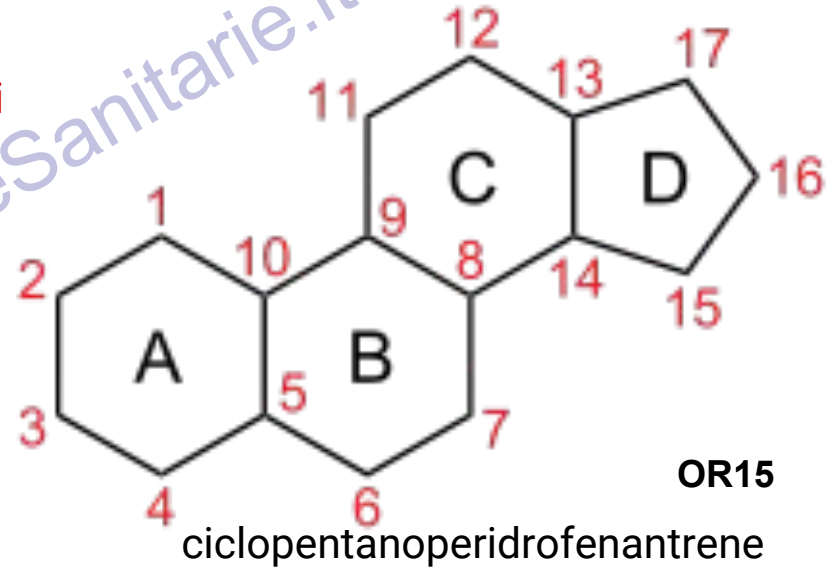
BP Technologies Sanitarie.it

Gli ormoni steroidei

Gli **ormoni steroidei** derivano da una molecola comune che è il ciclopentanoperidrofenantrene (idrocarburo tetraciclico, base degli steroli e degli steroidi).

Essi comprendono:

- ❖ **mineralcorticoidi**
- ❖ **glucocorticoidi**
- ❖ **estrogeni**
- ❖ **androgeni**
- ❖ **progestinici**

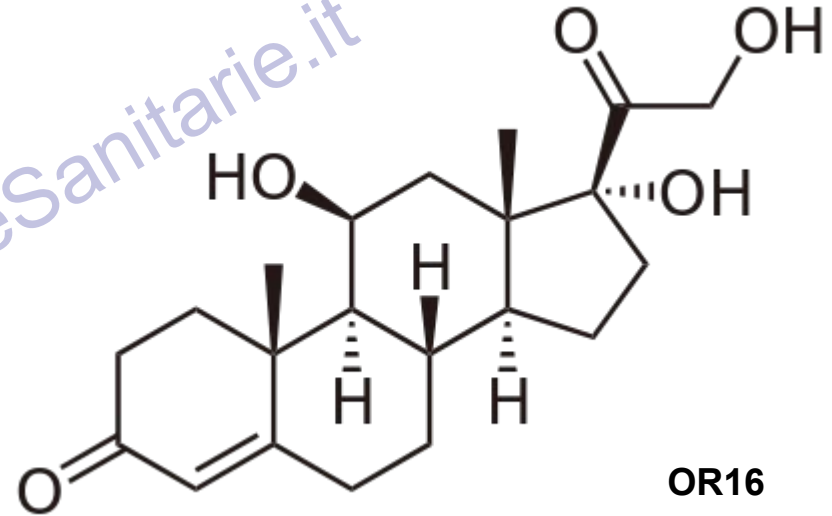


Gli ormoni steroidei

Mineralcorticoidi - glucocorticoidi

sono prodotti dalla corteccia surrenale e controllano rispettivamente

- ❖ l'escrezione (i mineralcorticoidi)
- ❖ il riassorbimento (i glucocorticoidi) degli ioni sodio e potassio e dell'acqua a livello renale
- ❖ il metabolismo del glucosio



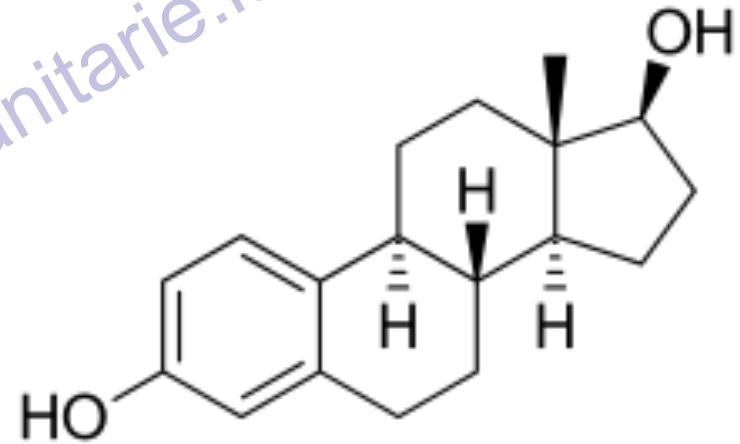
Cortisolo, uno delle principali esponenti dei glucocorticoidi

Gli ormoni steroidei

Estrogeni

Sono il prodotto di ovaie, placenta e anche in piccola parte delle ghiandole surrenali (estradiolo, estriolo ed estrone) e sono importanti per

- ❖ la regolazione del ciclo femminile
- ❖ lo sviluppo dei caratteri sessuali secondari



OR17

Estradiolo il più importante estrogeno

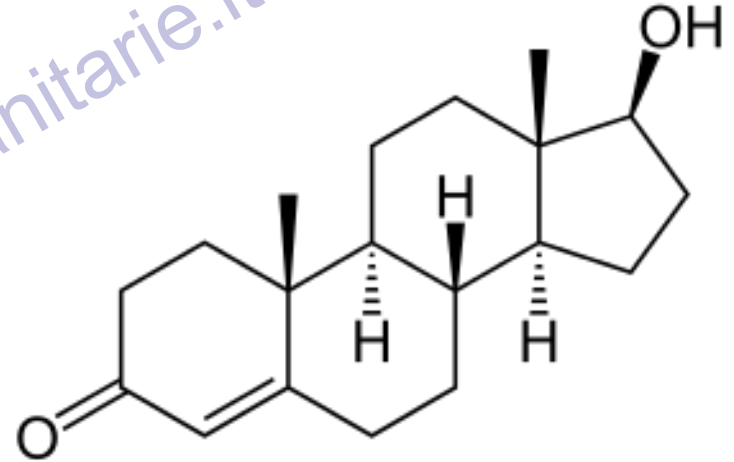
Gli ormoni steroidei

Androgeni (testosterone, androsterone)

Sono legati alla:

- ❖ alla formazione e maturazione degli spermatozoi
- ❖ allo sviluppo dei caratteri sessuali secondari

Sono prodotti nella corteccia surrenale e nel tessuto interstiziale dei testicoli.



Testosterone

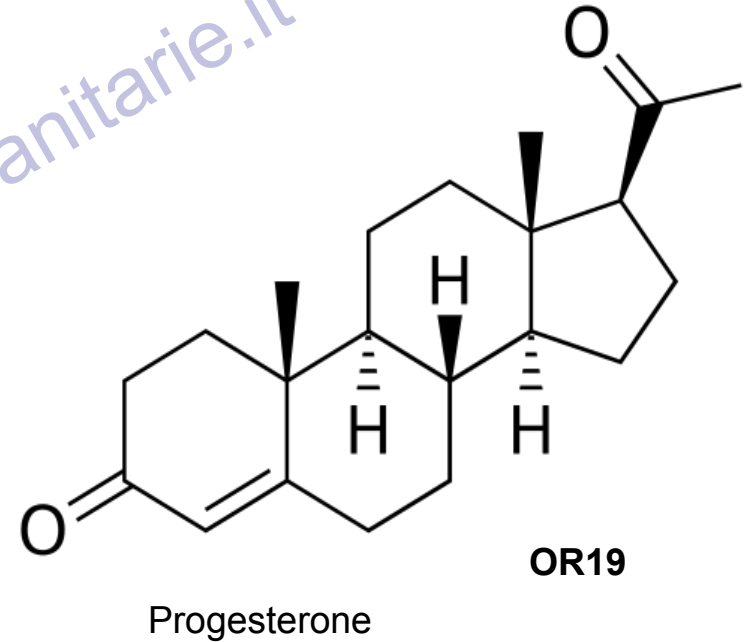
OR18

Gli ormoni steroidei

Progestinici (progesterone)

Sono secreti dal corpo luteo.

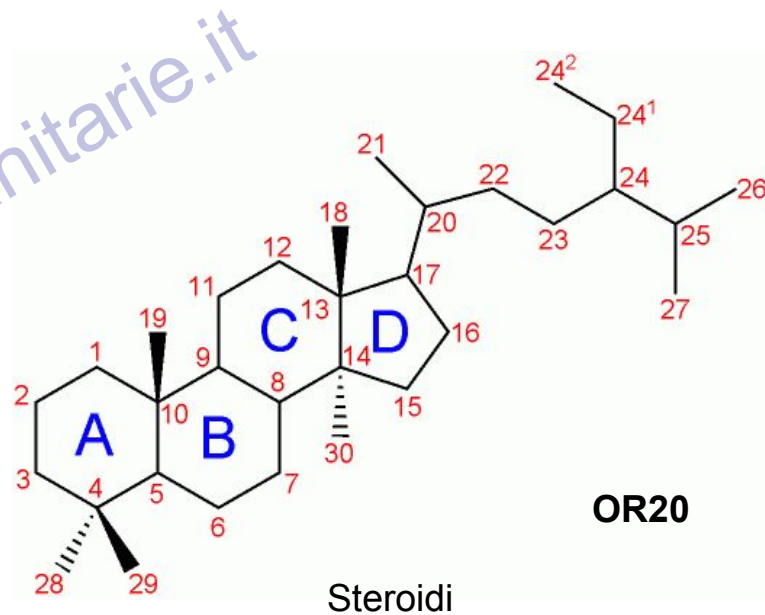
Inibiscono la produzione delle gonadotropine ipofisarie (FSH e LH).



Gli ormoni steroidei

L'importanza di questi ormoni dal punto di vista industriale è legata al loro uso in alcune terapie:

- ❖ antinfiammatorie
- ❖ contraccettive
- ❖ anabolizzanti



Gli ormoni steroidei

Gli ormoni steroidei si ottengono grazie a processi di **bioconversioni** (o **biotrasformazioni**).

Le bioconversioni sono una combinazione di sintesi chimiche e di interventi di biocatalizzatori che come ci insegna la microbiologia industriale possono essere enzimi estratti da microrganismi o microrganismi interi.

In altre parole stiamo parlando di sintesi in parte legate alla chimica tradizionale e in parte a vere e proprie trasformazioni biologiche.

I microrganismi possono intervenire anche solo in alcune fasi e in modo molto utile lavorando sulla produzione di un solo stereoisomero, per esempio. Si hanno così prodotti molto purificati.

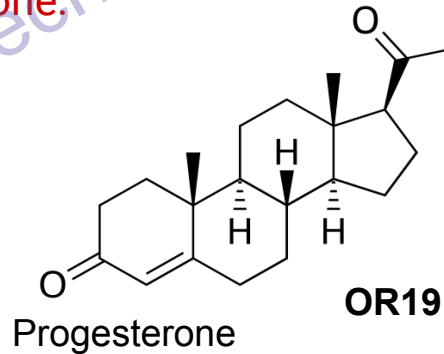
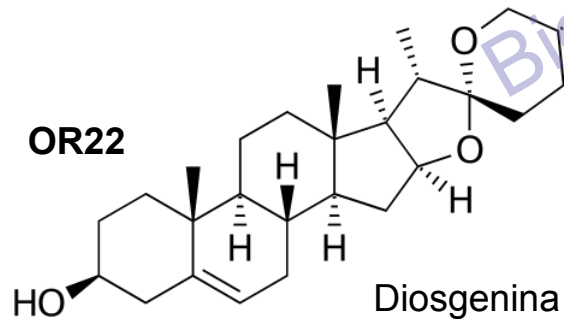
In genere si parte da substrati naturali di origine animale o vegetale.

Gli ormoni steroidei

Steroli vegetali li forniscono ad esempio il barbasco e la soia.

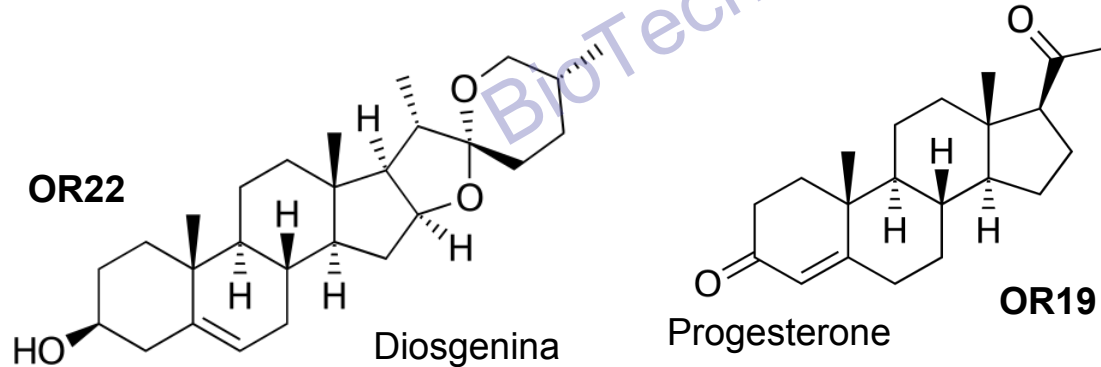
Il **barbasco** è una pianta messicana che produce tuberi, da cui si può partire per sintetizzare il progesterone.

Dioscorea mexicana (nella foto) e Dioscorea composita sono le due specie coinvolte che forniscono la **diosgenina**, precursore appunto del progesterone.



Gli ormoni steroidei

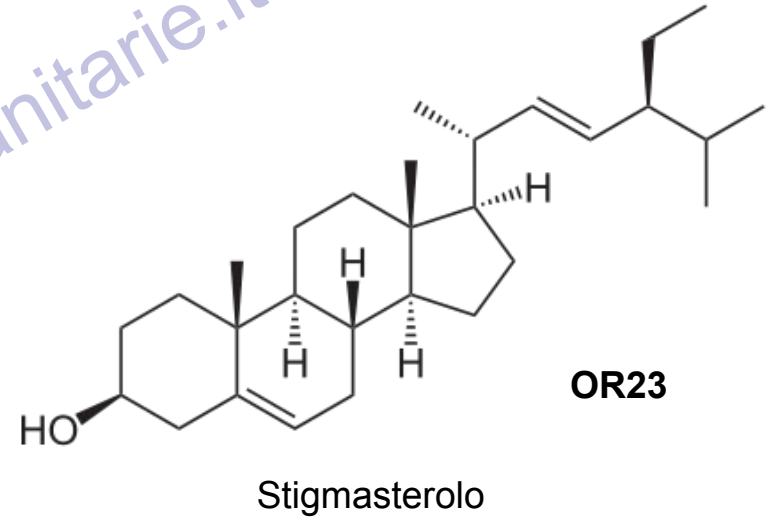
La pianta come si può vedere nella foto è caratterizzata da un fusto che nella sua parte inferiore si allarga formando una struttura piuttosto voluminosa e legnosa (caudex)
 La sua superficie è suddivisa in placche poligonali regolari separate da profonde fessure che diventano protuberanti con l'età.



Gli ormoni steroidei

Dall'olio di semi di soia, dalla colza e da altri legumi, invece si ricava lo **stigmasterolo**, sempre per la produzione di progesterone ed altri steroli.

I batteri più coinvolti nelle bioconversioni sono il **Gluconobacter oxydans** e il **Mycobacterium fortuitum**. Grazie a loro vengono svolte reazioni chimiche che, se effettuate in laboratorio, sarebbero molto più difficoltose. Per esempio: inserimento di doppi legami, deidrogenazioni, ossidoriduzioni, idrossilazioni ...



La vitamina C

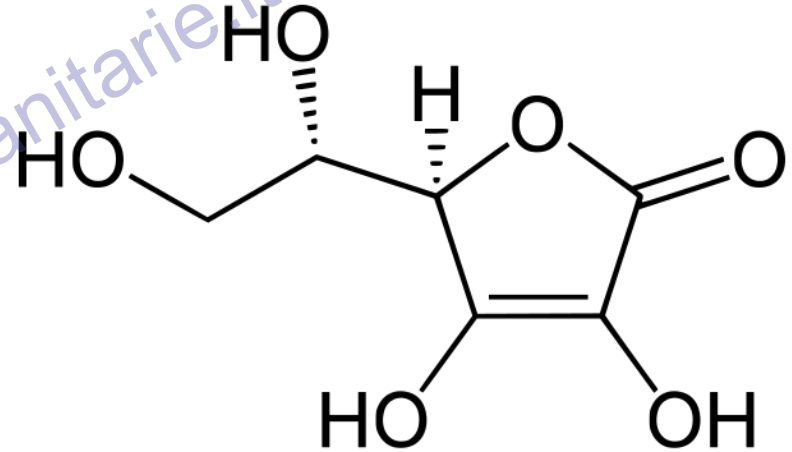


BioTechnologiesSanitarie.it

La vitamina C

Vitamina C Nota anche come **acido ascorbico**, è un composto organico ad attività antiossidante. Oltre che come integratore viene utilizzata:

- come additivo alimentare (E300)
- per sciogliere le macchie di ferro dalle piscine in vetroresina
- nella produzione della plastica per velocizzare i processi di sintesi
- e in molti altri campi



Vitamina C (acido ascorbico)

VIC1

La vitamina C

La sintesi negli animali avviene a partire da monosaccaridi.

La sintesi industriale è molto complessa, quasi totalmente chimica, ma c'è, tra i tanti passaggi, da segnalare l'intervento del *Gluconobacter oxydans* che catalizza la trasformazione del D-sorbitolo in L-sorbosio. Quindi rientra anche questa negli esempi di bioconversione.



Confezioni di Vitamina C come integratore alimentare in un drug store americano

VIC2

Gli antibiotici



BioTechnologieSanitarie.it

Gli antibiotici

Antibiotici

Gli antibiotici sono farmaci antimicrobici prodotti naturalmente dai microrganismi durante la idiofase cioè la fase stazionaria di crescita. Si tratta di metaboliti quindi secondari che hanno un compito ben preciso: uccidere o almeno limitare la crescita di altri microbi “concorrenti”.

I primi antibiotici, le penicilline, risalgono agli anni '40 del secolo scorso ma già dieci anni dopo si registrava il primo caso di resistenza (genere Shigella).

Attualmente si conoscono migliaia di molecole, naturali o semisintetiche, che possono essere inserite in questa categoria ma è sempre più alto il numero di microbi, soprattutto batteri, che manifestano forme di resistenza anche multiple.

Gli antibiotici

Anzi, la velocità di immissione nel mercato di nuovi farmaci è superata dalla velocità con cui compaiono queste forme di resistenza.

Il pericolo che possano riaffacciarsi pandemie di malattie infettive è quindi concreto, secondo le proiezioni dell'OMS.

Per questo i processi produttivi biotecnologici che possono utilizzare batteri sottoposti a mutazioni per ottenere ceppi alto-produttori è visto come una possibile soluzione.

Si rimanda alla pagina dedicata ai [farmaci antimicrobici](#) in cui vengono trattati gli antibiotici, il fenomeno dell'antibiotico resistenza e l'uso dell'antibiogramma a scopo diagnostico per un'analisi più dettagliata dei principi generali e della loro classificazione.

Gli antibiotici

Upstream

Microrganismi: muffe (**Aspergillus** e **Penicillium**), batteri filamentosi come **Streptomyces** e non filamentosi del genere **Bacillus**.

Terreno di coltura: scarti della produzione agroalimentare addizionati di fonti di azoto (estratti di carne, farine animali o vegetali, latte e derivati), sali minerali, vitamine, fonti di crescita differenti a seconda del microrganismo.

Fase preliminare: prima di passare al bioreattore bisogna effettuare fasi di sporificazione, gemmazione e vegetazione che sono legate alla tipologia di microrganismo utilizzato. Per ognuna occorre studiare bene le condizioni ottimali a partire dal terreno di coltura.

Gli antibiotici

La fase vegetativa corrisponde alla **trofofase** ovvero la fase di crescita esponenziale. Infatti, come già ricordato, gli antibiotici sono dei metaboliti secondari che vengono prodotti nella **idiofase**. Quindi, nella trofofase il terreno di coltura è particolarmente arricchito per ottenere il massimo dello sviluppo.

Processo: **fed-batch** (spesso preceduto dal processo batch)

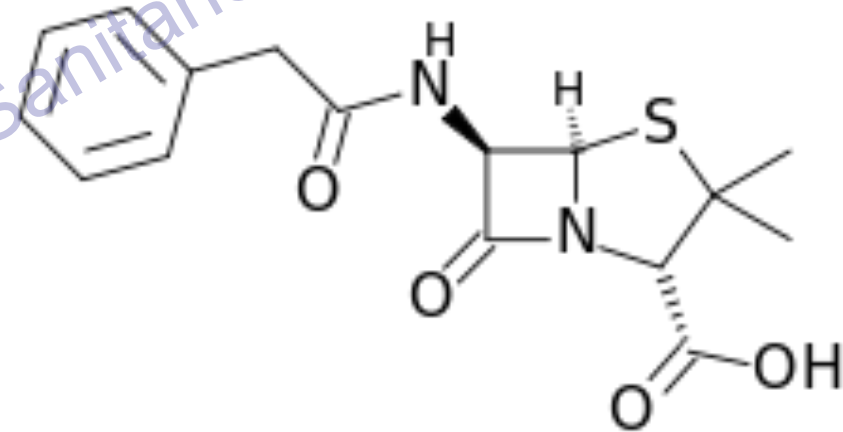
Bioreattore: **STR**, di acciaio inossidabile, di **capacità da 30 a 200 m³**. Si preferiscono volumi ridotti perché sono più facili le contaminazioni vista la natura dei microbi produttori, l'esigenza di aggiungere in maniera continuativa il terreno di coltura da un certo punto in avanti e i tempi lunghi. La produzione è ridotta rispetto ad altri metaboliti.

Downstream (lo vedremo in particolare nella penicillina)

Gli antibiotici: penicillina G

La **penicillina G** viene prodotta dal fungo **Penicillium chrysogenum**. Deriva dal *P. notatum* usato da Fleming ma è stato sottoposto a processi di mutagenesi e ricombinazione per migliorare la capacità produttiva (50 g/L).

Il processo biotecnologico porta alla formazione di prodotti ad uso umano, veterinario e precursori di penicilline semisintetiche.



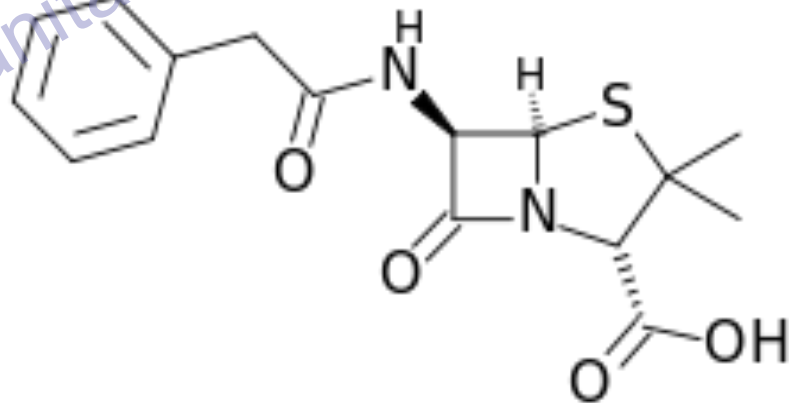
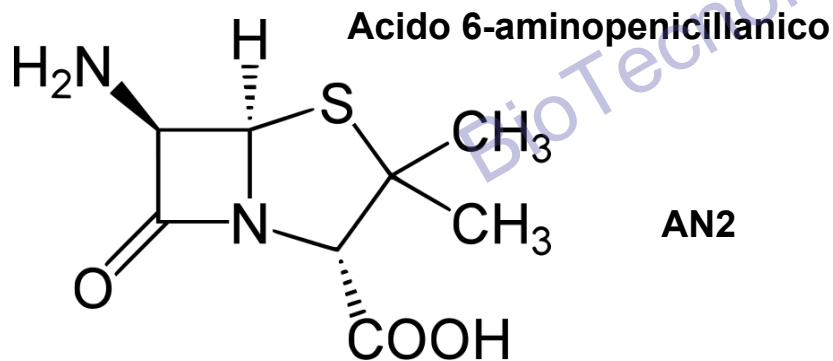
Penicillina G

AN1

Gli antibiotici: penicillina G

La penicillina G come tutti gli antibiotici β -lattamici viene sintetizzata a partire da aminoacidi.

L'unione dell'**anello β -lattamico** (il cuore del farmaco) e dell'**anello tiazolidinico** porta alla formazione del **6-APA** (mediata dal *Penicillium*)

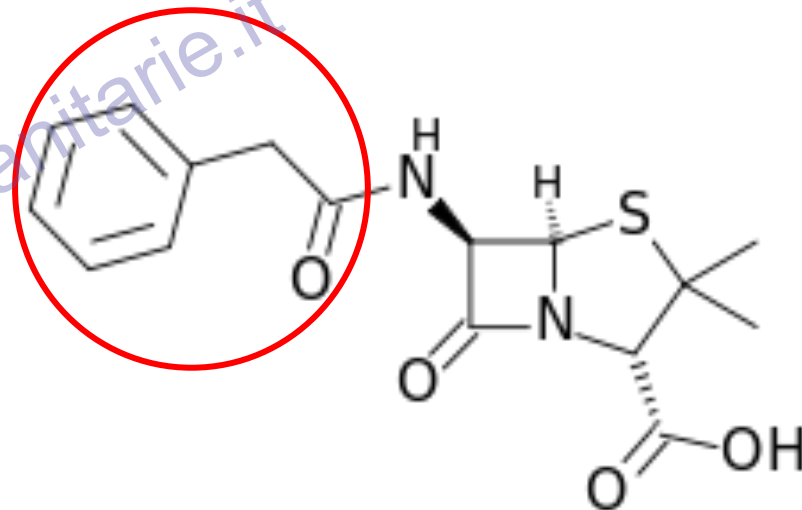
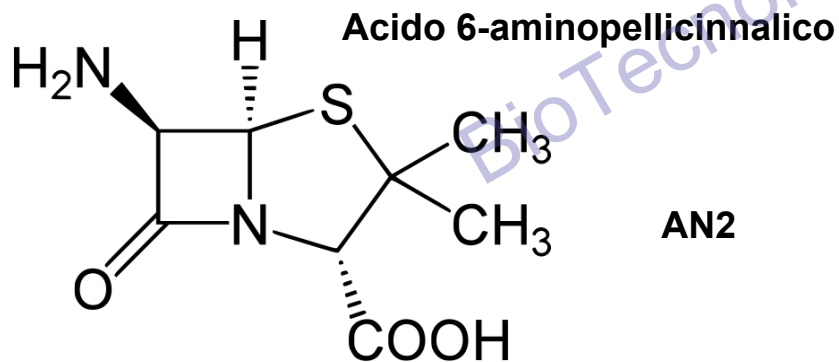


Penicillina G

AN1

Gli antibiotici: penicillina G

La parte della molecola che fa la differenza è la **catena laterale** (evidenziata nel cerchio), perché influenza la resistenza della molecola in ambiente acido, lo spettro antimicrobico, la sensibilità alla β -lattamasi e molte altre proprietà.



Penicillina G

Gli antibiotici: penicillina G

Per ottenere la catena laterale è necessario aggiungere l'**acido fenilacetico** e **fenossiacetico**. Con altri tipi di precursori è possibile aumentare il range di molecole con diverse catene laterali tra cui poi scegliere quelle che hanno attività antimicrobica.

Vediamo ora il processo di produzione nei suoi particolari.

Fase 1 o di sviluppo in un reattore STR, utilizzando un processo batch, a temperatura di 25-27°C e a pH 6-7, in un terreno ricco di glucosio o saccarosio con il corn-steep liquor come fonte di azoto più appropriati fattori di crescita e addizionato di oli vegetali come agenti antischiuma, si procede alla crescita logaritmica (trofofase) della muffa. Il controllo più importante da fare è che il corn-steep liquor non aumenti l'acidità.

Gli antibiotici: penicillina G

Fase 2 o di produzione. Si passa ad un altro bioreattore con il processo fed-batch. Si aumenta il pH a 7 - 7,2. Il terreno di coltura ha come fonte di carbonio glucosio e lattosio. Bisogna evitare fenomeni di inibizione a feedback monitorando le fonti di carbonio e di azoto e quindi si tara la velocità di rifornimento su quella di utilizzo. Le fonti di N e di C devono essere complesse per una metabolizzazione più lenta. È a questo punto che si aggiungono acido fenilacetico e fenossiacetico come precursori della catena laterale.

Gli antibiotici

Fase 3 o downstream.

Filtrazione per separare la massa microbica.

Essiccazione del terreno di coltura per evitare l'uso di temperature alte (l'antibiotico è termolabile).

Estrazione con solventi (butil acetato in questo caso).

Precipitazione frazionata utilizzando basi organiche che formano sali poco solubili con la penicillina G.

Sterilizzazione mediante ulteriore filtrazione per evitare uso di temperature alte.

Le penicilline semisintetiche vengono prodotte a partire dalla G con distacco preliminare della catena laterale mediante enzima specifico e successiva sintesi chimica di una nuova catena.

Photo credits (slide 3 - 17)

11 By Jawahar Swaminathan and MSD staff at the European Bioinformatics Institute - <http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/images/entry/1wip600.png>, displayed on <http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/entry/1wip/summary>, Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=5972705>

12 By Nephron (Own work) [CC BY-SA 3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0>) or GFDL (<http://www.gnu.org/copyleft/fdl.html>)], via Wikimedia Commons - https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AMelanoma_-_cytology_field_stain.jpg

13 By Colby Fisher - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=25213532>

14 By Alexeenko - Yesterday in the lab, CC BY-SA 4.0, <https://en.wikipedia.org/w/index.php?curid=51214367>

Photo credits (slide 18 - 25)

- V1 Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=219804>
- V2 Di Charles Jervas - The Yorck Project: 10.000 Meisterwerke der Malerei. DVD-ROM, 2002. ISBN 3936122202. Distributed by DIRECTMEDIA Publishing GmbH., Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=153268>
- V3 By Ernest Board - [2] images.wellcome.ac.uk, Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=8776638>
- V4 By BruceBlaus - Own work, CC BY-SA 4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=44967603>
- V5 By USAID - USAID Bangladesh, Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1021>
- V6 Di Photo Credit: James GathanyContent Providers(s): CDC - This media comes from the Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library (PHIL), with identification number #7988.Note: Not all PHIL images are public domain; be sure to check copyright status and credit authors and content providers.English | Slovenščina | +/-, Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1314479>
- V7 By Photo Credit: Cynthia GoldsmithContent Providers(s): CDC/ Dr. Terrence Tumpey - This media comes from the Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library (PHIL), with identification number #8160.Note: Not all PHIL images are public domain; be sure to check copyright status and credit authors and content providers.English | Slovenščina | +/-Originally from en.wikipedia; description page is/was here., Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2544046>

Photo credits (slide 26 - 35)

V8 By National Institutes of Health; originally uploaded to en.wikipedia by TimVickers (25 October 2006), transferred to Commons by Quadell using CommonsHelper. - California Department of Health Services, Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=6424584>

V9 Di CDC Influenza Laboratory https://www.cdc.gov/h1n1flu/images.htm?s_cid=cs_001, Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=6736467>

V10 By Mouagip This vector graphics image was created with Adobe Illustrator. - File:Reassortment HiRes.jpg (Link Studio for NIAID), Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=15741917>

V11 By The Owl. - University of Pittsburgh Digital Archives. This photo was previously published in 1957 Owl student yearbook of the University of Pittsburgh, pg.14-15., Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=8477194>

V12 Di CDC Public Health Image Library - This media comes from the Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library (PHIL), with identification number #2121. Note: Not all PHIL images are public domain; be sure to check copyright status and credit authors and content providers. English | Slovenščina | +/-, Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=973324>

Photo credits (slide 36 - 42)

- A1 By Adenosine - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=9659630>
- A2 Foto pubblicata sotto [Creative Commons](#) [CC0 1.0 Universal Public Domain Dedication](#)
- A3 Immagine di proprietà dello studio associato R&D

BioTechnologiesSanitarie.it

Photo credits (slide 43 - 48)

IN1 Di Nevit Dilmen (talk) - Self created from PDB entry with Cn3D Data Source:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/>, CC BY-SA 3.0,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1307948>

1N2 Di Nevit Dilmen - Self created from PDB entry with Cn3D Data Source:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/>, CC BY-SA 3.0,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1307702>

IN3 By Unknown photographer/artist - National Cancer Institute, AV Number: AV-8307-3705, Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=5580927>

1N4 See page for author [Public domain], via Wikimedia Commons -

https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AVials_of_Interferon_Image_3549-PH.jpg

IN5 By Linda Bartlett (Photographer) [Public domain or Public domain], via Wikimedia Commons -

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AInterferon_\(1\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AInterferon_(1).jpg)

Photo credits (slide 49 - 56)

OR1 By OpenStax College - Anatomy & Physiology, Connexions Web site.

<http://cnx.org/content/col11496/1.6/>, Jun 19, 2013., CC BY 3.0,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=30148134>

OR2 Pubblico dominio, <https://it.wikipedia.org/w/index.php?curid=71030>

OR3 By Photo by Eric Erbe, digital colorization by Christopher Pooley, both of USDA, ARS, EMU. - This image was released by the Agricultural Research Service, the research agency of the United States Department of Agriculture, with the ID K11077-1 (next). This tag does not indicate the copyright status of the attached work. A normal copyright tag is still required. See Commons:Licensing for more information. English | français | македонски | +/-, Public Domain,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=958857>

OR4 By User:Bensaccount - Own work, Public Domain,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=24673134>

OR5 Barbarossa at Dutch Wikipedia [GFDL (<http://www.gnu.org/copyleft/fdl.html>), CC-BY-SA-3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>) or CC BY-SA 2.5 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.5/>)], via Wikimedia Commons -

<https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3ALac-operon.jpeg>

Photo credits (slide 57 - 62)

OR6 By Daniele Pugliesi (Own work) [GFDL (<http://www.gnu.org/copyleft/fdl.html>) or CC BY-SA 3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>)], via Wikimedia Commons - https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AAgitated_vessel.svg

OR7 CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=290860>

OR8 Par Proinsulin.gif: Original uploader was Mr Hyde at cs.wikipediaderivative work: Zapyon (talk) Cette image vectorielle a été créée avec Inkscape. — Proinsulin.gif, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=16891004>

OR9 Di Ed (Edgar181) - Opera propria, Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=15160876>

OR10 Di Deposition authors: De Vos, A.M., Ultsch, M., Kossiakoff, A.A.; visualization author: User: Astrojan - <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3hhr>, CC BY 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=48734971>

OR11 Di Philippe Chanson and Sylvie Salenave - Acromegaly. Orphanet Journal of Rare Diseases 2008, 3:17. doi:10.1186/1750-1172-3-17, CC BY 2.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=15072125>

Photo credits (slide 63 - 74)

- OR12** Di Peter Forster, v. Varenna 75, CH-6600 Locarno User:Peter Forster mailto:pforster@nikko.ch
<http://www.pforster.ch> -
http://www.pforster.ch/ydisp/AF%204_16.htm, <http://www.pforster.ch/yOrigPics/Pics/FisiologiaEmoglobina.jpg>, CC BY 2.5, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1290631>
- OR13** Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1917646>
- OR14** By PookieFugglestein (Own work) [CC0], via Wikimedia Commons -
<https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AHematocrit.JPG>
- OR15** Di NEUROtiker - Opera propria, Pubblico dominio,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1839223>
- OR16** Di Calvero. - Selfmade with chemdraw., Pubblico dominio,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1673486>
- OR17** By NEUROtiker - Own work, Public Domain,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2321694>
- OR18** By NEUROtiker - Own work, Public Domain,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2321696>
- OR19** By Rhododendronbusch - Own work, Public Domain,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1240373>

Photo credits (slide 75 - 79)

OR 20 Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=381343>

OR21 By Rillke - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=18117349>

OR22 By Ayacop - Own work using: BKchem + Inkscape, Public Domain,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=919919>

OR23 Di NEUROtiker - Opera propria, Pubblico dominio,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=3657805>

Photo credits (slide 80 - 82)

VIC1 Di Yikrazuul - Opera propria, Pubblico dominio,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=5886009>

VIC2 By Raysonho @ Open Grid Scheduler / Grid Engine - Own work, CC0,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=45183927>

BioTechnologiesSanitarie.it

Photo credits (slide 83 - 93)

AN1 Di Ayacop - Opera propria, Pubblico dominio,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1010950>

AN2 By Yikrazuul - Own work, Public Domain,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=7348412>

BioTechnologieSanitarie.it