



Scoperta e Sviluppo dei Farmaci
Prof. Giovanni Cassani
Tecnogen Spa

25 ottobre 2004

Le biotecnologie nel processo di drug discovery

E I NUOVI FARMACI BIOTECNOLOGICI

Mercato farmaceutico globale

(circa 500 miliardi di \$)

- **Mercato farmaci biotech**
- (circa 40-50 miliardi di \$)
- Eritropoietina..... 10 miliardi \$
- Insulina..... 3,2 “
- GCSF..... 3,0 “
- Interferone beta..... 2,4 “
- Interferone alfa 2,0 “
- Ormone della crescita..... 2,0 “

Drug discovery: le prime domande.

- In generale, è facile o difficile fare un nuovo farmaco?
- Quale è meglio: un farmaco tradizionale (piccola molecola) oppure un farmaco biotecnologico?
- Quale tra i due è più facile da farsi?
- E' possibile fare un farmaco senza effetti collaterali (non voluti)?
- Quanto tempo ci vuole per sviluppare un farmaco?
- Quanto costa un nuovo farmaco?

Lo screening classico

- Una fonte di molecole (microbi, piante, librerie combinatoriali, molecular design, in silico, ecc.)
- Uno o più saggi *in vitro*
- SELEZIONE
- Uno o più saggi *in vivo*
- SELEZIONE
- Inizio studi preclinici (farmacologici: farmacodinamici e farmacocinetici, tossicologici, ecc.)

Drug discovery: target selection

- E' possibile trovare un bersaglio unico nell'organismo umano?(un farmaco senza effetti collaterali?)
- La maggior parte dei bersagli dei farmaci sono proteine.
- Nell'organismo umano esistono circa 100000 proteine diverse.
- Esistono famiglie di proteine, per esempio:
- Più di 500 diverse proteasi umane,
- Più di 500 diverse proteinchinasi umane, ecc.

L'approccio biotecnologico

- Individuazione di una molecola (macromolecola) in generale di origine umana ad attività già nota o da studiare.
- Proteine ricombinanti: produzione mediante ingegneria genetica in batteri o in cellule eucariotiche (microbiche o animali) di quantità utili per gli studi preclinici e clinici.
- Anticorpi: isolamento e produzione di un anticorpo monoclonale selettivo e specifico per un bersaglio molecolare definito oppure cellulare.

Tipi di prodotti biotecnologici

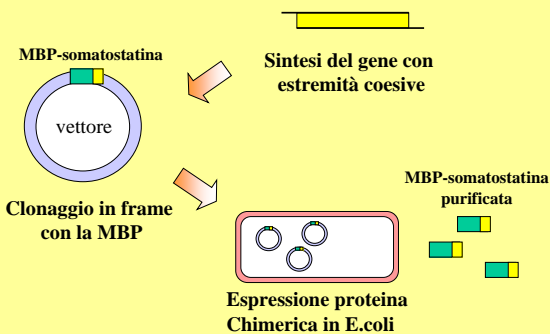
- Proteine umane
- Proteine umane chimeriche
- Anticorpi monoclonali murini.
- Anticorpi monoclonali chimerici, oppure umanizzati.

Nuovi prodotti dall'ingegneria genetica?

- **Genomica:**
 - **Proteomica:**
- ↓
- **35-40000 geni umani**
 - **100000 proteine diverse**
- **O forse 20000 ??**

Il primo prodotto biotecnologico: una chimera

.... la somatostatina (14aa)



United States Patent [19] [11] **4,237,224**
Cohen et al. [45] **Dec. 2, 1980**

[54] PROCESS FOR PRODUCING BIOLOGICALLY FUNCTIONAL MOLECULAR CHIMERAS

[75] Inventors: Stanley N. Cohen, Portola Valley; Herbert W. Boyer, Mill Valley, both of Calif.

[73] Assignee: Board of Trustees of the Leland Stanford Jr. University, Stanford, Calif.

[21] Appl. No.: 1,021

[22] Filed: Jan. 4, 1979

Related U.S. Application Data

[63] Continuation-in-part of Ser. No. 959,288, Nov. 9, 1978, which is a continuation-in-part of Ser. No. 687,430, May 17, 1976, abandoned, which is a continuation-in-part of Ser. No. 525,691, Nov. 4, 1974.

Mertz et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, vol. 69, pp. 3370-3374, Nov. 1972.

Cohen, et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, vol. 70, pp. 1293-1297, May 1973.

Cohen et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, vol. 70, pp. 3240-3244, Nov. 1973.

Chang et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, vol. 71, pp. 1030-1034, Apr. 1974.

Ullrich et al., Science vol. 196, pp. 1313-1319, Jun. 1977.

Singer et al., Science vol. 181, p. 1114 (1973).

Itakura et al., Science vol. 198, pp. 1056-1063 Dec. 1977.

Komaroff et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, vol. 75, pp. 3727-3731, Aug. 1978.

Chemical and Engineering News, p. 4, May 30, 1977.

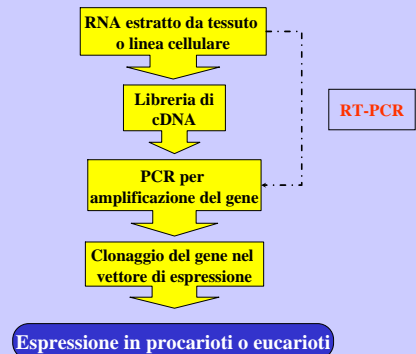
Chemical and Engineering News, p. 6, Sep. 11, 1978.

Primary Examiner—Alvin E. Tanenholz
Attorney, Agent, or Firm—Bertram I. Rowland

"As I was informed Cohen insisted that the invention had no commercial application, was not patentable, and was really only a minor extension of what had been performed by others. However, he agreed to be a good academic citizen and cooperate if Boyer would go along with the filing. Reimers then called me and asked me if I knew what a plasmid is? I have a Ph.D. in organic chemistry and minor in biochemistry, but I received my degree in 1954 and this was 1974. I told Reimers that I did not know, but would find out. He then suggested that maybe he should find someone else, but I assured him that at that time there were no molecular biologists in the patent field and he was not likely to find anyone else more capable than myself to write the case. He then requested that I speak to Cohen and Boyer and get the information that I needed."

Bertram Rowland and the Cohen/Boyer Cloning Patent from the George Washington Law and Technology Alumni Gallery

Schema di clonaggio



Recombinant enzyme, hormones and cytokines

DRUG	MAIN INDICATION	APPLICANT	First approval in EU
Insulin, human	diabetes mellitus type 1	Lilly Deutschland GmbH Lilly Industries Novo Nordisk Hoechst	12/1987
Interleukin-2, IL-2 (Aldesteukin)	hypernephrom (for T-cell activation)	Chiron GmbH	12/1989
Somatotropin (human growth hormone)	dwarfism	Lilly Deutschland GmbH Pharmacia GmbH Serono Pharma GmbH Novo Nordisk Ferring GmbH	02/1991
Glucagon	hypoglycemic reaction	Novo Nordisk	03/1992
Erythropoietin beta (Epoetin beta)	renal anemia	Boehringer Mannheim	05/1992
Interferon gamma 1b	chronic granulomatosis	Dr. Karl Thomae (now Boehringer Ingelheim)	1992

Interferon alfa-2b	hairy cell leukemia, carcinomas, Papilloma induced genital warts	Essex Pharma GmbH	03/1993 02/2000
Erythropoietin alpha (Epoetin alpha)	renal anemia	Janssen-Cilag	04/1993
GM-CSF (Molgramostim)	neutropenia (e.g. after chemotherapies with cytostatics)	Essex Pharma GmbH Sandoz AG	04/1993
Interferon alpha-2a	hairy cell leukemia, carcinomas, Papilloma induced genital warts	Hoffmann-La Roche AG kohl pharma GmbH*	04/1993
Faktor VIII	hemophilia A	Bayer AG Baxter Deutschl. GmbH Armour Pharma GmbH	07/1993
G-CSF, glycosylated (Lenograstin)	neutropenia (e.g. after chemotherapies with cytostatics)	Rhône-Poulenc Rorer GmbH Chugai Rhône-Poulenc	10/1993
tissue plasminogen activator, t-PA (Alteplase)	coronary thrombosis, thrombosis	Dr. Karl Thomae GmbH	04/1994

Glucocerebrosidase (Imiglucerase)	morbus Gaucher	Genzyme B.V.	06/1994
G-CSF (Filgrastim)	neutropenia (e.g. after chemotherapies with cytostatics)	Hoffmann-La Roche AG kohl pharma GmbH*	08/1994
hum. DNase (Dornase alfa)	mucoviscidosis	Hoffmann-La Roche AG	09/1994
Follitropin alpha	ovaries stimulation, IVF	Serono Laboratories UK	10/1995
Interferon beta-1b	multiple sclerosis	Schering AG	11/1995
Factor VII	bleeding with hemophilia A and B	Novo Nordisk	02/1996
Insulin, Lispro	diabetes mellitus type 1	Lilly Deutschland GmbH	05/1996
Follitropin beta	ovaries stimulation, IVF	Organon Ltd.	10/1996
Gewebe-Plasminogen-Aktivator, r-PA (Retepase)	coronary thrombosis, thrombosis	Boehringer Mannheim GmbH	11/1996
Faktor IX	hemophilia B	Genetics Institute of Europe B.V.	08/1997

Interferon beta-1a	multiple sclerosis	Biogen France S.A. Ares-Serono	03/1997
Hirudine	treatment of heparin-associated thrombocytopenia (HAT) type II	Behringwerke	03/1997
Desirudine (Hirudin without sulphate at Tyr 65)	prevention of thrombosis during surgery	Ciba Europarm Ltd., UK	03/1997
Calcitonin (TN; Teracaltonin)	osteoporosis, Paget's disease; hypercalcaemia	Unigene UK Ltd.	01/1999
Interferon alfacon-1	hepatitis C	Yamanouchi	02/1999
Platelet cells derived growth factor, r-hPDGF (Becaplermin)	treatment of ulceritis of diabetes patients	Janssen-Cilag N.V.	03/1999
Tumor necrosis factor alfa-1a (TNF alfa-1a)	palliative therapy of sarcomas; adjuvant therapy after surgery of tumor patients	Boehringer Ingelheim	04/1999
Miroctocog alpha (Factor VIII without B domain)	preparation for surgery of hemophilia patients	Genetics Institute	04/1999

Thyrotropin alfa (TSH)	scintigraphy of thyroid gland with radioactive iodine	Genzyme B.V.	07/1999
Insulin aspart	diabetes mellitus type 1	Novo Nordisk A/S	09/1999
Peginterferon alfa-2b (PEGylated Interferon alfa-2b)	hepatitis C	Schering-Plough Europe	05/2000
Insulin glargin	Diabetes mellitus	HMR Deutschland/Aventis S.A.	06/2000
Etanercept (recombinant fusion protein of human TNF receptor and p75cl)	rheumatoid arthritis	Wyeth-Lederle	02/2000
Rashuricase	tumor induced hyperuricemia	Sanofi S.A.	02/2001
Tenecteplase	coronary thrombosis, thrombosis	Boehringer Ingelheim	02/2001
Choriongonadotropin alfa (chorionic gonadotropin, hCG)	ovaries stimulation, IVF	Ares Serono	02/2001
Lutropin alfa	maturation of follicles, IVF	Ares Serono	02/2001

Darbepoetin alfa	renal anemia	Amgen Europe	06/2001
Agalsidase alfa (alpha-galactosidase)	therapy of Fabry disease	TKT Europe-5S AB	08/2001
Agalsidase beta (alpha-galactosidase)	therapy of Fabry disease	Genzyme B.V.	08/2001
Anakinra interleukin-1 receptor antagonist	rheumatoid arthritis	Amgen GmbH	03/2002
Dynepo Erythropoietin delta	renal anaemia	Aventis S.A.	02/2002
Pegfilgrastim	neutropenia (e.g. after chemotherapies with cytostatics)	Amgen Europe	08/2002

Drotrecogin alfa activated protein C	severe sepsis with multiple organ failure	Eli Lilly	08/2002
Diboterminalfa bone morphogenetic protein	treatment of acute tibia fractures in adults	Genetics Institute Europe B.V.	09/2002
Aldurazyme Laromidase (Glycosaminoglycan alpha-L-iduronohydrolase)	mucopolysaccharidosis I	Genzyme Europe B.V.	06/2003

Leading Therapeutic Areas for Biotech Companies

	Oncology	Cardiovascular	Immune Disorders	Central Nervous System (CNS)*
Number of biotech companies	181	78	>100	>100
Number of products in development	395	123	256	>250

Source: Burnll & Co.

*Neurological disorders, mental illness, etc.

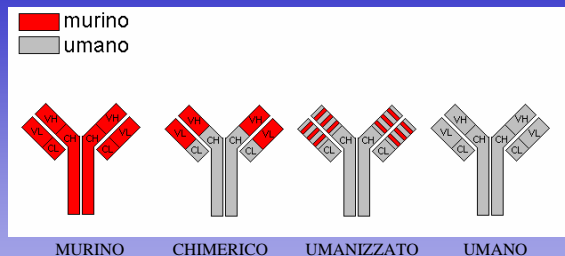
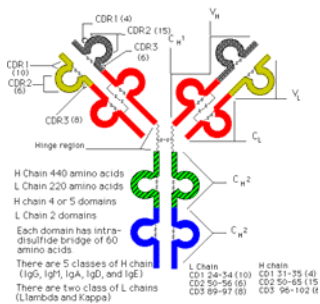
2004 Wisconsin Technology Network

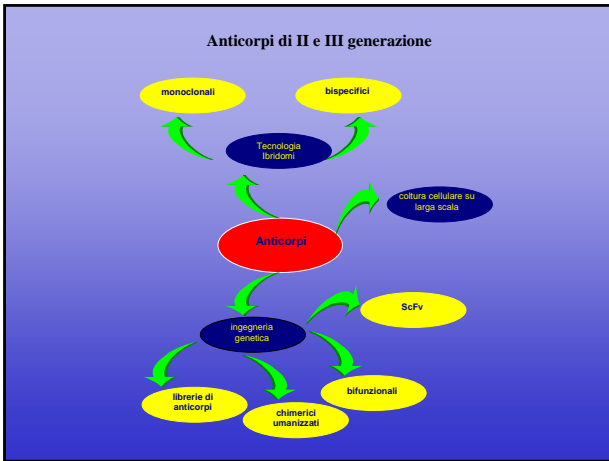
Recombinant vaccines

hepatitis-B antigen (rHBs-Ag)	hepatitis B prevention	SmithKline Beecham GmbH	09/1989
hepatitis B vaccine combinations (contain rHBs-Ag)	hepatitis B prevention; additional vaccination against hepatitis A, tetanus, pertussis or/and diphtheria	SmithKline Beecham Biologicals, MSD Pasteur Mérieux	07/1996 09/1996 02/1997 07/1997 05/1998
Triacelluvax® three recombinant <i>B. pertussis</i> toxins	vaccination against tetanus, pertussis, and diphtheria	Chiron S. p. A.	01/1999
hepatitis-B antigens S, pre-S1, pre-S2	hepatitis B prevention	Medeva Pharma	03/00
glycosylated recombinant diphtheria toxin CRM197 (Pneumococcus conjugate vaccine, Prevenar®)	prevention of Pneumococcus infections with children	Wyeth-Lederle	02/2001
Lyme disease vaccine (Pneumococcus conjugate vaccine, Prevenar®)	prevention of infections	Wyeth-Lederle	02/2001

CLASSI DI IMMUNOGLOBULINE: FUNZIONE

- **IgG:** la più importante classe di immunoglobuline nella risposta immune secondaria. IgG1 e IgG3 attivano la via classica del complemento. Attivazione di cellule del sistema immunitario attraverso il legame ai recettori per l'Fc.
- **IgM:** anticorpo predominante nella risposta immune primaria. Attivazione via classica del complemento.
- **IgA:** anticorpi presenti nelle mucose. Protezione delle superfici epiteliali da agenti infettivi
- **IgD:** funzione biologica precisa non nota, potrebbero avere un ruolo nel differenziamento dei linfociti indotto dall'antigene
- **IgE:** si sono evolute per dare immunità verso parassiti elmintici ma nella società industriale sono associate a malattie allergiche





ANTICORPI DI TERZA GENERAZIONE:

estrazione mRNA da ibridoma

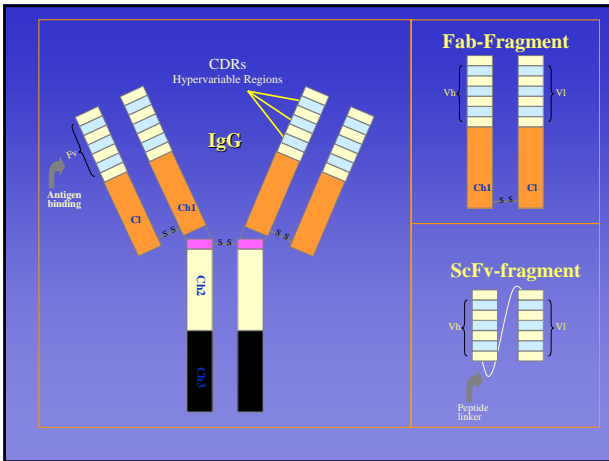
 sintesi cDNA

clonaggio e sequenziamento regioni variabili della catena leggera e della catena pesante dell'anticorpo

ANTICORPI CHIMERICI: regioni variabili catena pesante e leggera murine e regioni costanti umane

ANTICORPI UMANIZZATI: CDRs (Complementarity Determining Regions) murine, FRs (Frameworks) umani e regioni costanti umane

ScFv (Single Chain Fv): regioni variabili delle catene pesante e leggera dell'anticorpo unite mediante un "linker"



Termodinamica e cinetica dell'interazione antigene-anticorpo

$Ag + Ab \rightleftharpoons Ag:Ab$

Costanti termodinamiche: K_d , costante di dissociazione = $[Ag][Ab] / [Ag:Ab]$, misura dell'affinità di una particolare interazione e della sua specificità ($K_d \text{ target} \ll K_d \text{ non-target}$)

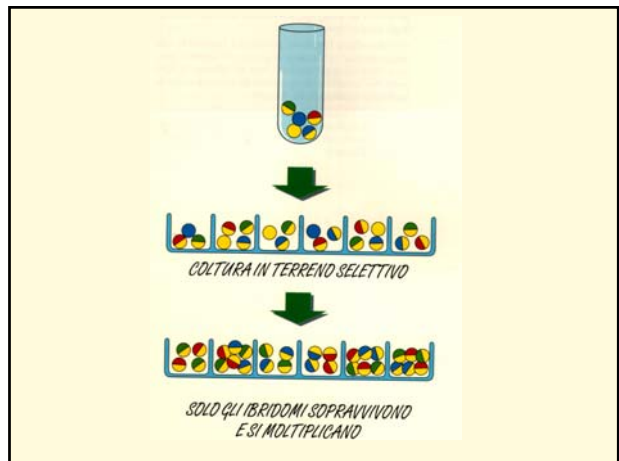
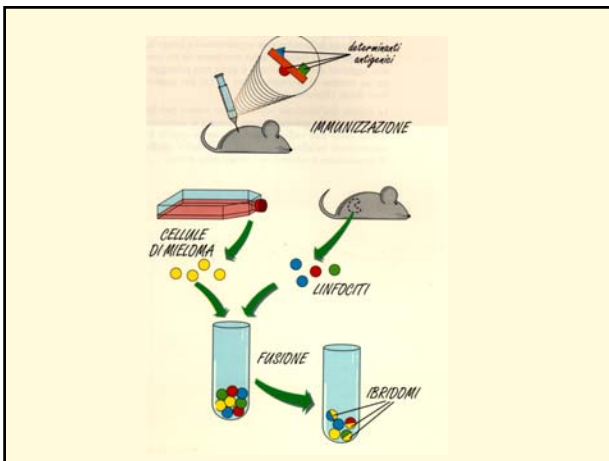
Costanti cinetiche: $k_{on} = V_{on} / [Ag][Ab]$, dove V_{on} indica la velocità della reazione di associazione;

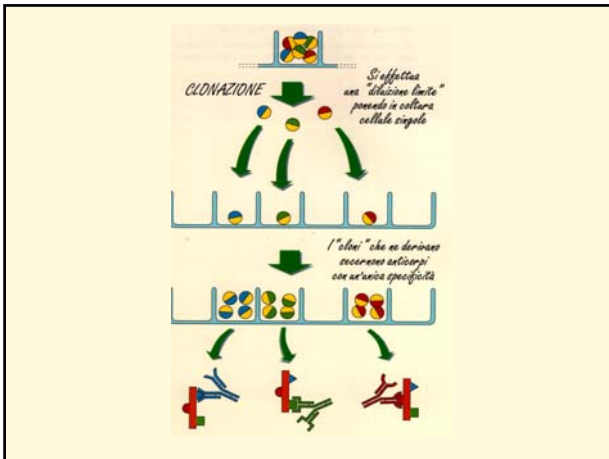
$k_{off} = V_{off} / [Ag:Ab]$, dove V_{off} indica la velocità della reazione di dissociazione

k_{off} e k_{on} forniscono una misura della velocità di distruzione e formazione del complesso immune, rispettivamente

$k_{off} / k_{on} = K_d$

è la relazione che intercorre tra le 3 costanti

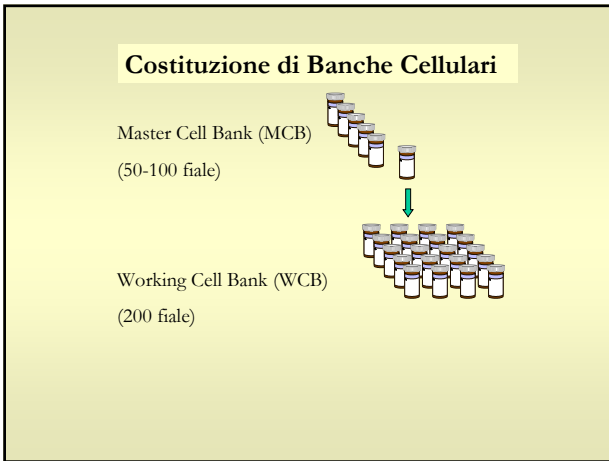




Sviluppo della linea cellulare

Ibridoma → Linea cellulare stabile

Ripetuti subclonaggi nel terreno finale
 Produttività alta e stabile
 Affinità adeguata
 Terreno "protein free" o "serum free"
 Nessun componente di origine animale per la crescita cellulare



Test di Biosicurezza

Master Cell Bank (MCB)	Sterility	sterile
	Test for Mycoplasma using Vero cells, Agar & broth: PTC 1993 & 21 CFR 610.30	negativo
	In vitro assay for the presence of bovine viruses according to PCR requirements (9 viruses: aBVDV, aBVA5, aBPV, aIBR, aPI3, aBRSV, aREO3, aRabies)	negativo
	14 days in vitro assay for the detection of viral contaminants using 3 detector cell lines	negativo
	In vitro detection of xenotropic retrovirus by Mink S-L- focus assay	negativo
	Detection of ecotropic murine retroviruses by the extended XC plaques assay	negativo
	In vivo test for the presence of inapparent viruses in suckling mice only	negativo
	Mouse antibody production (MAP) test (16 virus)	negativo
	Identification and characterization of cultured cells by analysis of 6 isoenzymes	conferma origine murina

Working Cell Bank (WCB)	Sterility	sterile
	Test for Mycoplasma using Vero cells, Agar & broth: PTC 1993 & 21 CFR 610.30	negativo
	Identification and characterization of cultured cells by analysis of 6 isoenzymes	conferma origine murina

Post Production Cell Bank (PPCB)	Test	
	Sterility	sterile
	Test for Mycoplasma using Vero cells, Agar & broth: PTC 1993 & 21 CFR 610.30	negativo
	14 days in vitro assay for the detection of viral contaminants using 3 detector cell lines	negativo
	In vitro detection of xenotropic retrovirus by Mink S-L- focus assay	negativo
	Detection of ecotropic murine retroviruses by the extended XC plaques assay	negativo
	In vivo test for the presence of inapparent viruses in suckling mice only	negativo
	Mouse antibody production (MAP) test (16 virus)	negativo
	Identification and characterization of cultured cells by analysis of 6 isoenzymes	conferma origine murina

Bulk Harvest	Test	
	LAL test (Endotossine)	<50 EU/ml
	Sterilità	sterile
	Particelle virali	inferiore a 1 x10 ⁶ VLP/ml
	Micoplasma	negativo
	Virus avventizi	negativo

Purificazione

Contaminanti virali:

- almeno 10 log di riduzione per i virus incapsulati
- almeno 6 log di riduzione per i virus non incapsulati
- almeno 2 step di rimozione virale robusti (> 4 log/step)

Fase I/II: 3 virus x 2 ripetizioni generalmente accettato.
 Fase III/IV: 4 virus x 3 ripetizioni

Se non c'è presenza di virus nelle banche o nel materiale biologico di partenza, si possono usare virus modello

DNA:

- < 100 pg/dose

Altri contaminanti:

- prodotti di leachage dalle resine
- endotossine (5 EU/kg/ora, via parenterale)

Purificazione

Cromatografia di affinità (AC)
 Proteina A:
Pro: risoluzione molto buona, veloce, binding diretto, resa alta, capacità buona
Contro: costosa, eluizione a basso pH, leakage di Proteina A, cleaning

Hydrophobic Charge Induction Chromatogr. (HCIC)
Pro: buona risoluzione, veloce, binding diretto, resa alta, cleaning, binding diretto a IEC
Contro: binding meno specifico della Proteina A

Cromatografia a scambio ionico (IEC)
Pro: veloce, resa alta, alta capacità, cleaning
Contro: risoluzione, necessaria bassa conducibilità del tampone di binding

Gel Filtrazione (GF)
Pro: resa, dialisi simultanea, capacità, cleaning
Contro: lenta, capacità bassa, impaccamento colonna

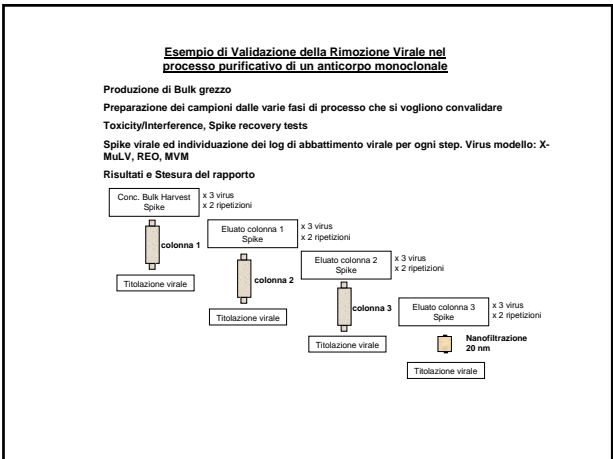
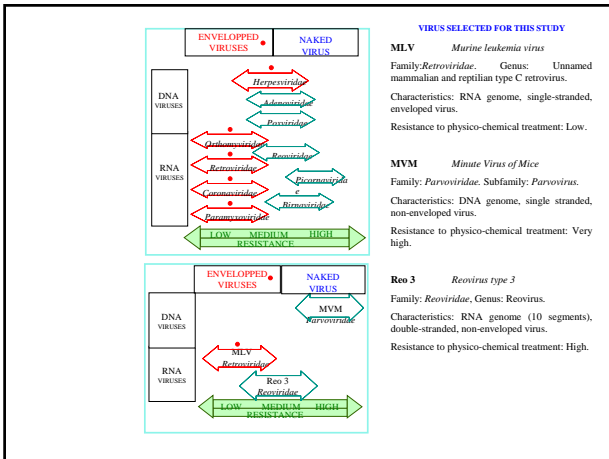
Cromatografia ad Interazioni Idrofobiche (HIC)
Pro: capacità alta, veloce, cleaning
Contro: risoluzione, conc. sali alta

Rimozione di contaminanti

Principio cromatografico	Endotossine	Acidi Nucleici	Virus
Proteina A	++	++	+++
Scambio Anionico	++	+++	+++
Scambio Cationico	+	+++	++
HCIC	++	+++	++
Gel Filtrazione	+	+	+
HIC	+	+++	++

Inattivazione/Rimozione virale

pH acido	0-6 log riduzione virale (dipendente da tipo di virus e pH)
pH basico	0-6 log riduzione virale (dipendente da tipo di virus e pH)
calore	variabile (dipendente da tipo di virus e temperatura)
solventi/detergenti	variabile (dipendente da tipo di virus e trattamento)
nanofiltrazione (15-50 nm)	3-5 log (dipendente da dimensione del virus)



Raccomandazioni

- Usare uno step di purificazione basato su cromatografia di affinità
- Usare uno step a scambio ionico per rimuovere DNA
- Avere almeno 2 validi step di rimozione/inattivazione virale
- Usare terreno di coltura "protein free" e senza componenti di origine animale
- Usare materiale facile da pulire
- Materiale e strumentazione facile da validare
- Considerare scale down e scale up

Marketed Monoclonal antibodies as April 2003: Fields of application

Name	Company	Indication	Description	
Orthoclone [®] (Muridomab)	J&J Ortho Biotech 1986	Transplant rejection	Murine IgG2ak anti-CD3 Mab	TRANSPLANT REJECTION 3
Simullect [®] (Basiliximab)	Novartis	Transplant rejection	Chimeric IgG1k anti-CD25 (IL-2R)	
Zenapax [®] (Daclizumab)	PDL, Roche 2002	Transplant rejection	Humanized IgG1k anti-CD25 (IL-2R)	
Synagis [®] (Palivizumab)	MedImmune Abbott 1998	RSV infection	Humanized IgG1k anti-RSV protein	INFECTION 1
ReoPro [®] (Abciximab)	Centocor, Eli Lilly, Fujiwara 1994	Antithrombotic, antianginal, restenosis, Crohn, ischemia	Chimeric IgG1k Fab' anti GPIIb/IIIa R (Activated platelet)	CARDIOVASCULAR 1
Remicade [®] (Infliximab) Humira [™] (Adalimumab)	Schering-Plough 1998 Abbot 2003	Crohn's disease RA	Chimeric IgG1k anti-TNF Human IgG1k anti TNF	INFLAMMATION AUTOIMMUNITY 2
Rituxan [®] (Rituximab)	Genentech, IDEC, Roche 1997	NHL	Chimeric IgG1k anti CD20	ONCOLOGY 5
Herceptin [®] (Trastuzumab)	Genentech, Roche 1998	Breast cancer	Humanized IgG1k anti HERneu	
Mylotarg [™] (Gemtuzumab)	Weith 2000	AML	Humanized IgG4-anti CD33 con-j-calicheamicin	
Campath [®] Alemtuzumab	Berlex 2001	NHL	Humanized IgG1k anti-CD52	
Zevalin [™] (Ibritumomab)	Schering, IDEC 2002	NHL	Murine IgG1k anti CD20 Radiopharmaceutical kit	

Source: FDA and various web sites

Marketed Monoclonal antibodies as April 2003: Fields of application

Name	Company	Indication	Description	
Orthoclone [®] (Muridomab)	J&J Ortho Biotech 1986	Transplant rejection	Murine IgG2ak anti-CD3 Mab	TRANSPLANT REJECTION 3
Simullect [®] (Basiliximab)	Novartis	Transplant rejection	Chimeric IgG1k anti-CD25 (IL-2R)	
Zenapax [®] (Daclizumab)	PDL, Roche 2002	Transplant rejection	Humanized IgG1k anti-CD25 (IL-2R)	
Synagis [®] (Palivizumab)	MedImmune Abbott 1998	RSV infection	Humanized IgG1k anti-RSV protein	INFECTION 1
ReoPro [®] (Abciximab)	Centocor, Eli Lilly, Fujiwara 1994	Antithrombotic, antianginal, restenosis, Crohn, ischemia	Chimeric IgG1k Fab' anti GPIIb/IIIa R (Activated platelet)	CARDIOVASCULAR 1
Remicade [®] (Infliximab) Humira [™] (Adalimumab)	Schering-Plough 1998 Abbot 2003	Crohn's disease RA	Chimeric IgG1k anti-TNF Human IgG1k anti TNF	INFLAMMATION AUTOIMMUNITY 2
Rituxan [®] (Rituximab)	Genentech, IDEC, Roche 1997	NHL	Chimeric IgG1k anti CD20	ONCOLOGY 5
Herceptin [®] (Trastuzumab)	Genentech, Roche 1998	Breast cancer	Humanized IgG1k anti HERneu	
Mylotarg [™] (Gemtuzumab)	Weith 2000	AML	Humanized IgG4-anti CD33 con-j-calicheamicin	
Campath [®] Alemtuzumab	Berlex 2001	NHL	Humanized IgG1k anti-CD52	
Zevalin [™] (Ibritumomab)	Schering, IDEC 2002	NHL	Murine IgG1k anti CD20 Radiopharmaceutical kit	

Source: FDA and various web sites

Recombinant antibodies

DRUG	MAIN APPLICATION	APPLICANT	First approval in EU
Abciximab (ReoPro®)	anti coagulant for treatment of myocardial infarcts	Centocor Europe B.V.	05/1995
Vofatumumab (Humuspect®)	detection of colon carcinomas	Organon Teknika	11/1996
Rituximab (Mabthera®)	treatment of CD20-positive B-cell lymphomas	Roche	1998
Basiliximab (Simullect®)	prevention of transplant rejection (kidney transplantation)	Novartis	10/1998
Daclizumab (Zenapax®)	prevention of transplant rejection (kidney transplantation)	Roche Registration Ltd., UK	02/1999
Palivizumab (humanised IgG)	monoclonal antibody against Respiratory Syncytial Virus (RSV) subtypes A and B	Abbott Laboratories Ltd., UK	05/1999
Infliximab (Remicade®)	anti- TNF-alpha- antibody for treatment of immune and inflammatory diseases	Centocor (marketed by Schering-Plough)	08/1999

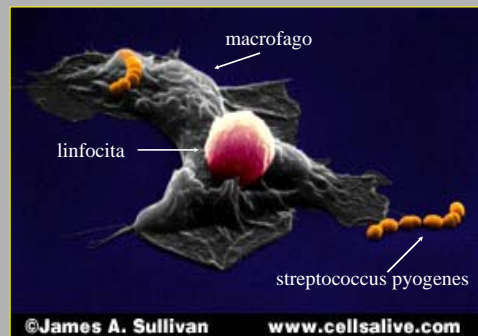
Trastuzumab (anti-HER2-antibody, Herceptin®)	breast cancer; HER2-receptor found with 30% of all cases	Roche	09/2000
Alemtuzumab (Campath®)	anti-CD52-antibody for therapy of chronic lymphocytic leukemia (CLL) when alkylating cytosinates fail	Millenium & Ilex UK Ltd.	03/2001
Adalimumab (Humira®)	anti-TNF-alpha- antibody for therapy of rheumatoid arthritis	Abbott	03/2003
Cetuximab (Erbix®)	chimeric IgG antibody against epidermal growth factor receptor (EGFR) for treatment of colon carcinoma	ImClone, Merck KGaA	02/2004

ANTICORPI: MECCANISMO DI AZIONE

- attivazione delle cellule del sistema immunitario attraverso il recettore per l'Fc
- attivazione dell'ADCC (Antibody Dependent Cell Cytotoxicity)
- attivazione del complemento

DISTRUZIONE DELLE CELLULE TUMORALI MEDIATA DA ANTICORPI MONOCLONALI

- attraverso il legame alla cellula tumorale l'anticorpo monoclonale può indurre una risposta infiammatoria provocando la distruzione della cellula tumorale da parte del sistema immunitario
- l'anticorpo monoclonale può interferire con la crescita o la regolazione della cellula tumorale legandosi ad un fattore di crescita critico o ad un recettore per un fattore di crescita
- induzione di anticorpi anti-idiotipici che possono mimare l'antigene tumorale ed indurre una attiva risposta immunitaria anti-tumore



Perché molte multinazionali chimiche hanno deciso di puntare sul farmaceutico?

- Perché quello farmaceutico rimane un settore **"attractive"**
- L'**innovazione** del prodotto rimane ancora la chiave del processo economico
- Bisogna avere prodotti di successo

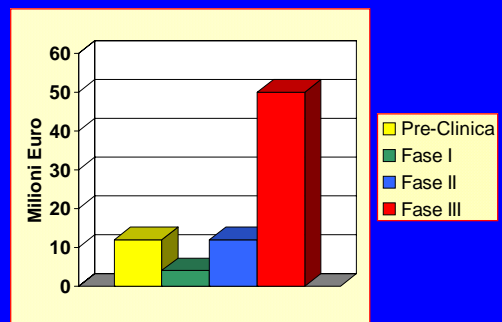
4 punti per un successo

- Mercato globale
- Mercato grande
- Differenziazione clinica (valore terapeutico aggiunto)
- Rimborso (politica economica)

I potenziali scenari dei prossimi anni

- Contenimento dei costi
- Globalizzazione
- Alleanze strategiche, Mergers ed Acquisizioni
- Nuove tecnologie nella scoperta e nello sviluppo dei farmaci

COSTI ESTERNI SVILUPPO CLINICO (MEDIO)



Contenimento dei costi

- Le necessità di guadagni a breve termine continueranno a scontrarsi con la ricerca a lungo termine nella competizione per i fondi
- Ci sarà una maggiore selezione nella scelta dei progetti da portare avanti
- I tempi, i rapporti costi benefici, e la qualità degli studi clinici saranno essenziali

Quesiti di base nello sviluppo clinico

- Qual è il prodotto?
- Per quale indicazione si propone?
- Quando potremo venderlo?
- Quale sarà il costo di sviluppo ed il ritorno?
- Di che cosa abbiamo bisogno?

RICHIESTA FARMACI x POPOLAZIONE = POTENZIALE COMMERCIALE

POPOLAZIONE POTENZIALE	Alta	Ipertensione Artrite/Artrosi Infezioni batteriche Analgesia Angina Dislipidemie	Asma Ansia Depressione Diabete Tipo 2 Acne Influenza	Obesità Demenza Vaccino AIDS Incontinenza urinaria Tumori Profilassi Infarto Mioc.
	Media	Allergie Herpes Emofilia Infezioni da Clamidia	Epilessia Cefalea Diabete Tipo 1 Trombosi	Insufficienza Cardiaca Bronchite cronica Epatite Psoriasi
	Bassa	Nanismo Malattia di Gaucher Gozzo Eritema Multiforme	Gotta Sindr. Colon irrit. Morbo di Crohn Infertilità	AIDS Sclerosi Multipla Sclerosi Later. Amiotr. Enfisema Fibrosi cistica Pancreatite
		Basse	Medie	Alte
NECESSITA' DI NUOVI FARMACI				

ASPETTATIVE DAL "FARMACO"

- 1900-1930 **Qualità (produttiva)**
- 1931-1960 **+ Sicurezza**
- 1961-1980 **+ Efficacia**
- 1981-2000 **+ Valore**

Sommatoria di Valori

Pre-clinica Clinica di sviluppo Clinica post-registr.

Studi in vitro

Studi in vivo

Esame dell'Autorità Sanitaria

Fase I

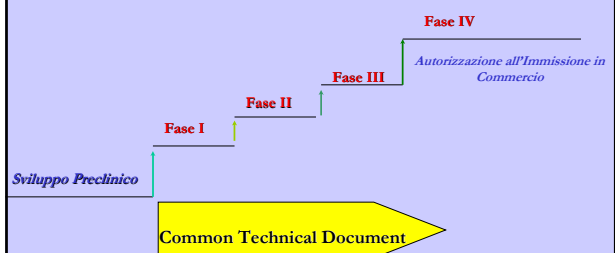
Fase II

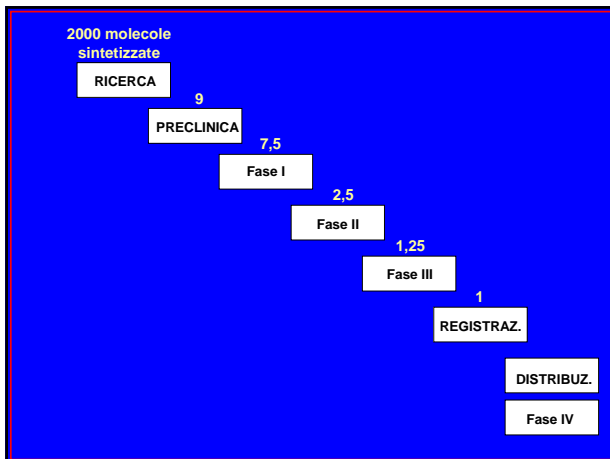
Fase III

Esame dell'Autorità Sanitaria

Fase IV

Documentazione Regolatoria





Un po' di numeri dagli USA

- Dal 1963 al 1989 sono stati sviluppati 1943 NCE (nuove molecole)
- Lo sviluppo clinico è stato interrotto prima della registrazione, nel 68% dei casi (1322):
 - 46% per problemi di Efficacia
 - 27% per problemi di Sicurezza
 - 23% per problemi economici

Punto chiave a cui tendere sarà quindi la ricerca e l'ottenimento di quella "sommatoria di valori"

↓

VALORE TERAPEUTICO AGGIUNTO

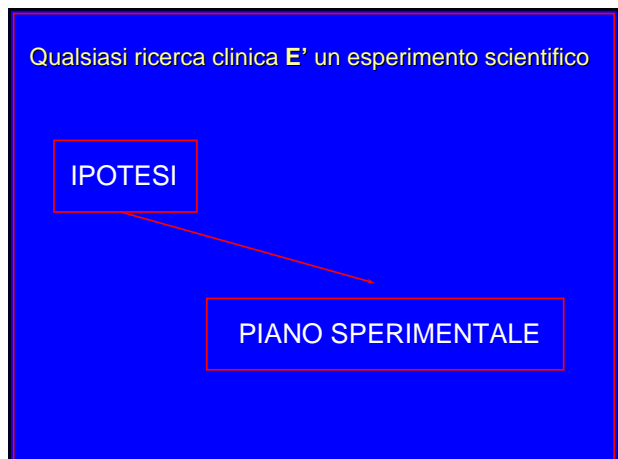
Valore Terapeutico Aggiunto: 3 possibilità

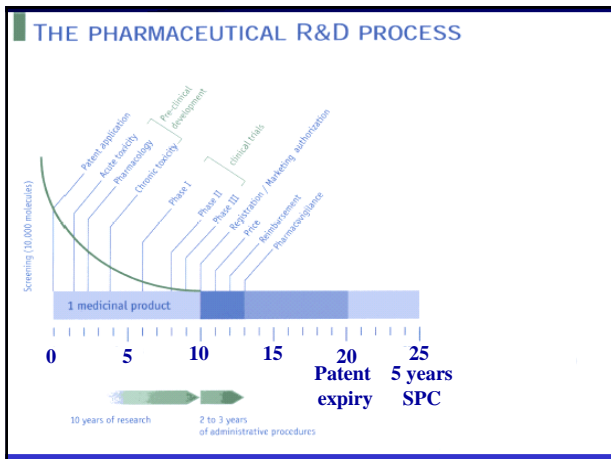
- Unica possibilità terapeutica
- Chiari vantaggi sul trattamento esistente
- Vantaggi minimi o assenti

Valore Terapeutico Aggiunto

Va ricercato:

- sempre
- in tutte le fasi
- continuamente
- con aggressive soglie *go/no go*
- con estrema rigerosità metodologica





Biogenerici o biosimili?

Leading Biotech Drugs and Their Biogeneric Status

Product (Brand)	Active Substance	Company	Approval Year	2002 Sales (millions)	Patent Exp. Date	Generics Under Dev.
Procrit	Epoetin alpha	Ortho Biotech	1990	\$3,972	2004/2006	Yes
Epogen	Epoetin alpha	Amgen	1989	\$2,840	2004	Yes
Remicade	TNF alpha	Centocor	1998	\$1,520	N/A	Yes
Neupogen	Filgrastim	Amgen	1991	\$1,503	2006	Yes
Rituxen	Monoclonal antibody	Genentech	1997	\$1,183	N/A	No
Avonex	Interferon beta-1a	Biogen	1996	\$1,097	N/A	Yes
Enbrel	Etanercept	Immunex (Amgen)	1998	\$938	N/A	No
Intron A	Interferon alpha-2b	Schering Plough	1995	\$857	2002	Yes
Betaferon	Interferon beta-1a	Schering AG	1995	\$682	N/A	Yes
Humulin	Human recombinant insulin	Eli Lilly	1992	\$630	N/A	Yes

Source: IMS; Burrill & Co. 2004 Wisconsin Technology Network

Drug	Animal	Value/Animal/Yr*
AAT	sheep	\$15,000
tPA	goat	75,000
Factor VIII	sheep	37,000
Factor IX	sheep	20,000
Hemoglobin	pig	3,000
Lactoferrin	cow	20,000
CFTR	sheep, mouse	75,000
Human Protein C	pig	1,000,000

*Current market price of the drug and supply produced by one animal.

Drug descriptions:

AAT	alpha-1-antitrypsin, inherited deficiency leads to emphysema
tPA	tissue plasminogen activator, treatment for blood clots
Factors VIII, IX	blood clotting factors, treatment for hemophilia
Hemoglobin	blood substitute for human transfusion
Lactoferrin	infant formula additive
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, treatment of CF
Human Protein C	anticoagulant, treatment for blood clots

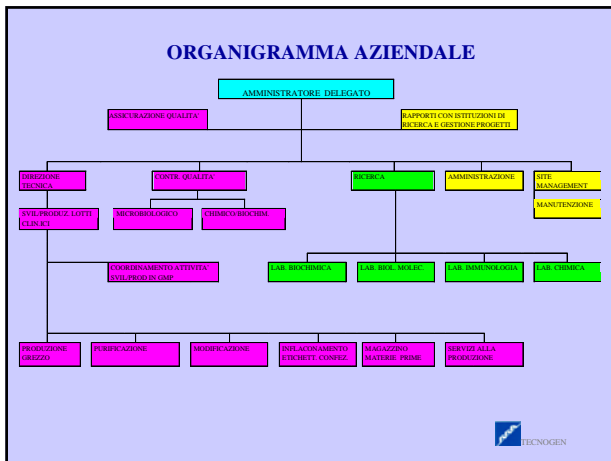
Table 1



TECNOGEN S.C.p.A.

AUTORIZZAZIONE ALLA PRODUZIONE DI MEDICINALI PER SPERIMENTAZIONE CLINICA

Decreto N. M-190/2003 del 23 settembre 2003



TECNOGEN “MISSIONE”

- RICERCA
- SVILUPPO →
- FORMAZIONE



officina farmaceutica

→














sperimentazione clinica

TECNOGEN AREA ANTICORPI

- MONOCLONALI
 - /// MURINI
 - /// CHIMERICI
 - /// UMANIZZATI
 - /// ScFv

- ideazione
- costruzione
- espressione
- sviluppo
- produzione di lotti (fino a 50 gr/lotto) di grado clinico (GMP)

Three step systemic therapy

	Vial 1 ST2146-biotin 100 mg iv infusion 20' in 100 ml saline			Step 1
		36-48 h		
	Vial 2 avidin 100 mg iv infusion 15' in 100 ml saline			Step 2
	Vial 3 Streptavidin 100 mg iv infusion 30'-60' in 250 ml saline			
		18-24 h		
	Vial 4 HSA-biotin 100-200 mg iv infusion 15' in 100 ml saline			Step 3
	Vial 5 biotin-DOTA 1 mg (⁹⁰ Y 2-3 GBq - 50-70 mCi)			
		15'-30'		