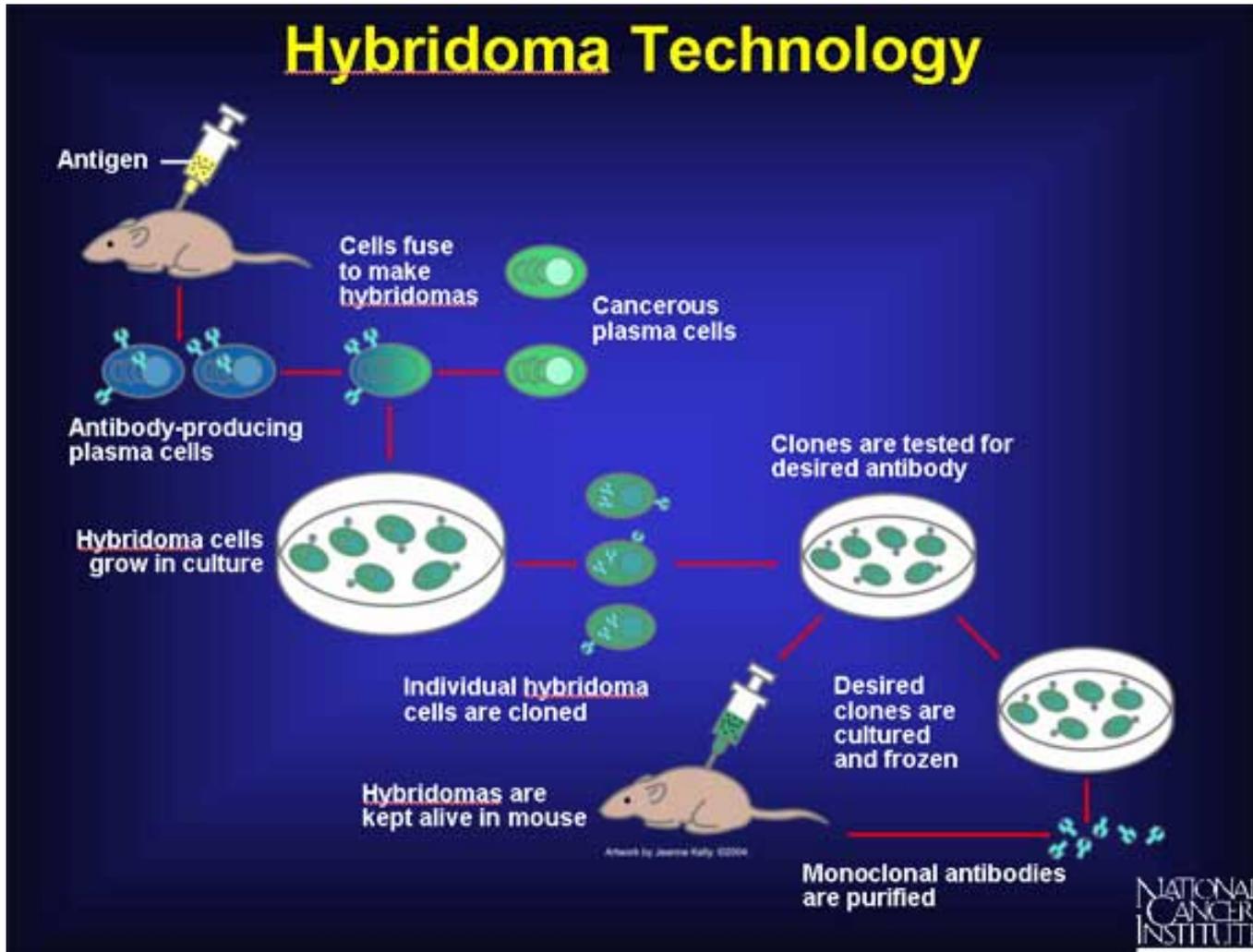


Anticorpi monoclonali

Hybridoma Technology



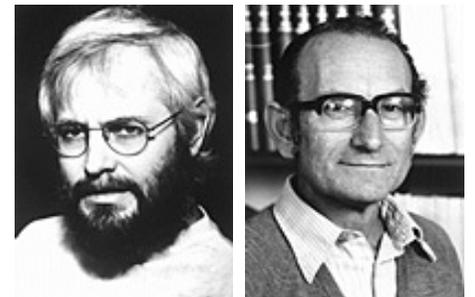
1984 – premio
Nobel per la
medicina

Kohler & Milstein

“Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity”

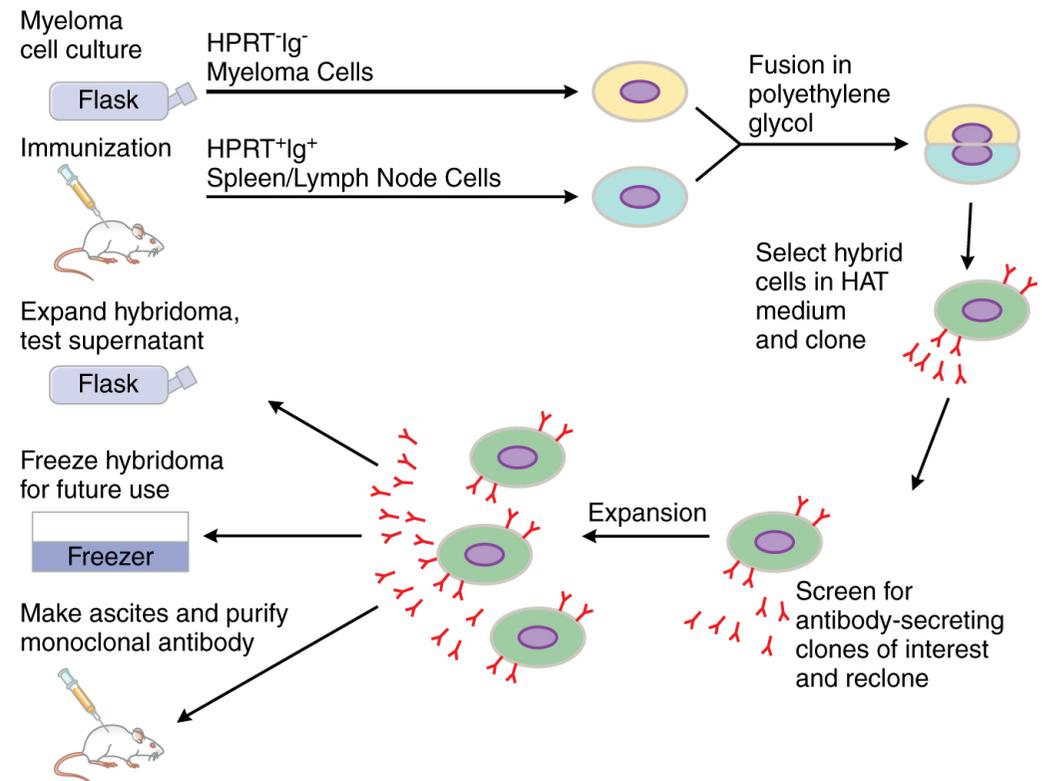
Nature. 1975 Aug 7;256(5517):495-7

Kohler & Milstein



Produzione di anticorpi monoclonali tecnologia dell'ibridoma

- Iperimmunizzazione dell'animale con l'antigene.
- Prelievo delle cellule B (dalla milza) e fusione con linee tumorali (es. mieloma).
- Selezione delle cellule su un terreno di crescita specifico (HAT medium).



L'HAT medium fa sì che solo le cellule in cui è avvenuta la fusione sopravvivano: il risultato è

la selezione di cloni cellulari IMMORTALIZZATI
che producono costantemente
anticorpo diretto contro l'antigene di interesse.

Terreno di cultura HAT (ipoxantina - amminopterina - timidina)

Amminopterina e' un inibitore della sintesi *de novo* delle purine = la sua presenza nel mezzo inibisce questo processo per cui le cellule dipendono dalle purine presenti nel mezzo e dalla "salvage" pathway per la loro sopravvivenza.

Timidina consente la produzione dei nucleotidi timidinici.

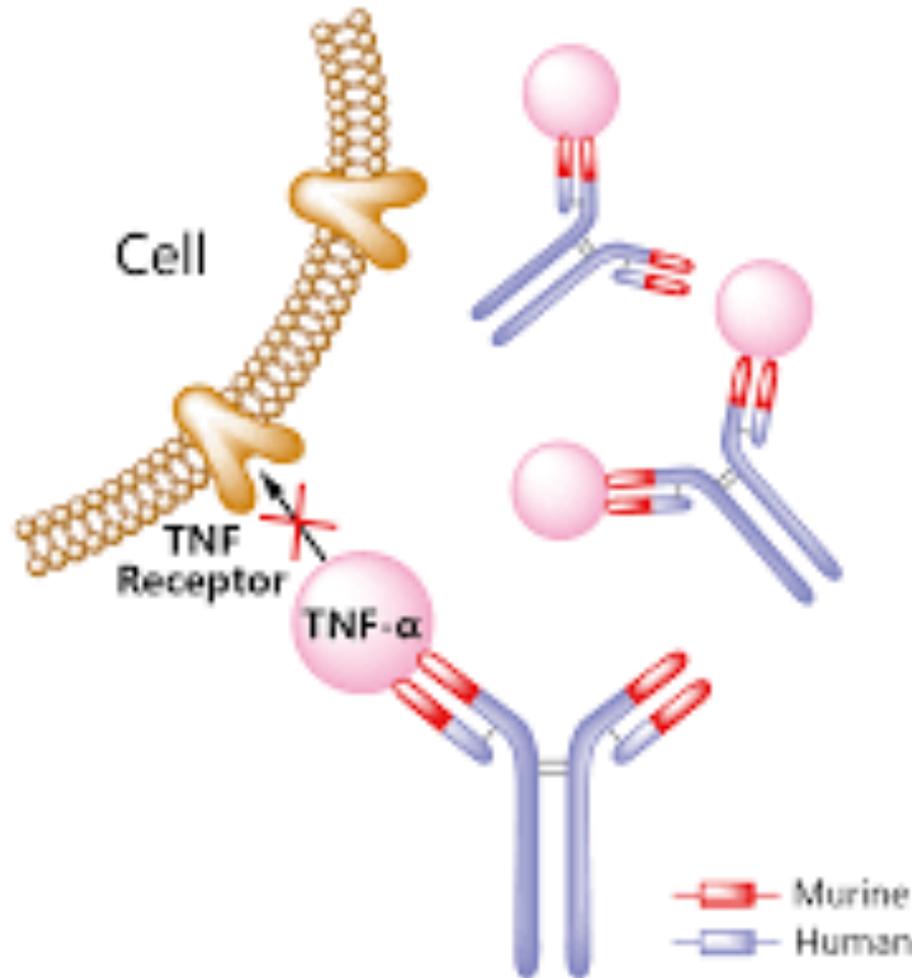
Ipoxantina consente la produzione dei nucleotidi guaninici da parte degli splenociti/linfociti B, degli ibridomi ma non delle cellule di mieloma che muoiono. Gli splenociti/linfociti B muoiono comunque in colture nel giro di 7-10 giorni.

Sopravvivono nel mezzo HAT solo gli **ibridomi** in quanto possono utilizzare l' ipoxantina come sorgente di nucleotidi guaninici (componente dello splenocita) e possono sopravvivere per lungo tempo in coltura (componente del mieloma).

Anticorpi terapeutici ottenuti con la tecnologia dell'ibridoma

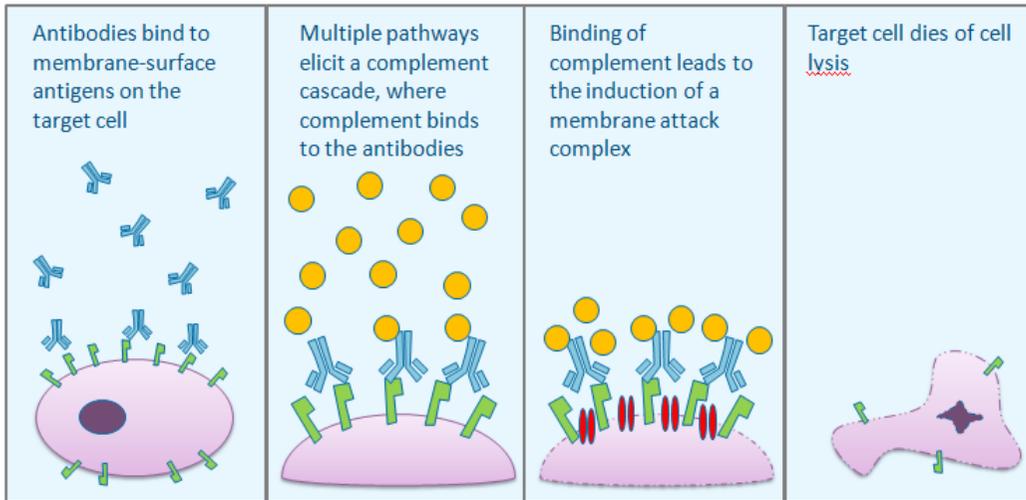
- Ha reso possibile l'ottenimento di grandi quantità di anticorpi specifici per un determinato antigene.
- Storicamente, il primo anticorpo monoclonale il cui uso è stato autorizzato nei pazienti è un anti-CD3 dei linfociti T, **MUROMONAB** o **ortoclone OKT3**, per trattare il rigetto acuto dopo trapianto di rene.
- L'uso prolungato di anticorpi murini nei pazienti determina l'insorgenza di sindromi "allergiche" caratterizzate da rigonfiamento delle articolazioni, eruzioni ed insufficienza renale.
- La produzione viene interrotta nel 2010

Meccanismi con cui gli anticorpi inducono gli effetti terapeutici

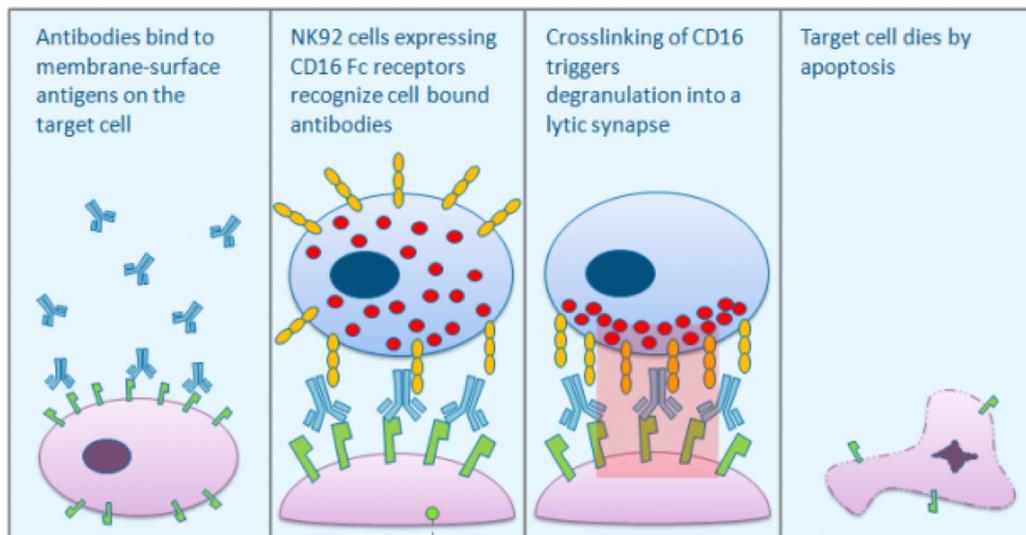


Modulazione diretta
dell'antigene bersaglio =
terapie anti-TNF α o anti-IgE

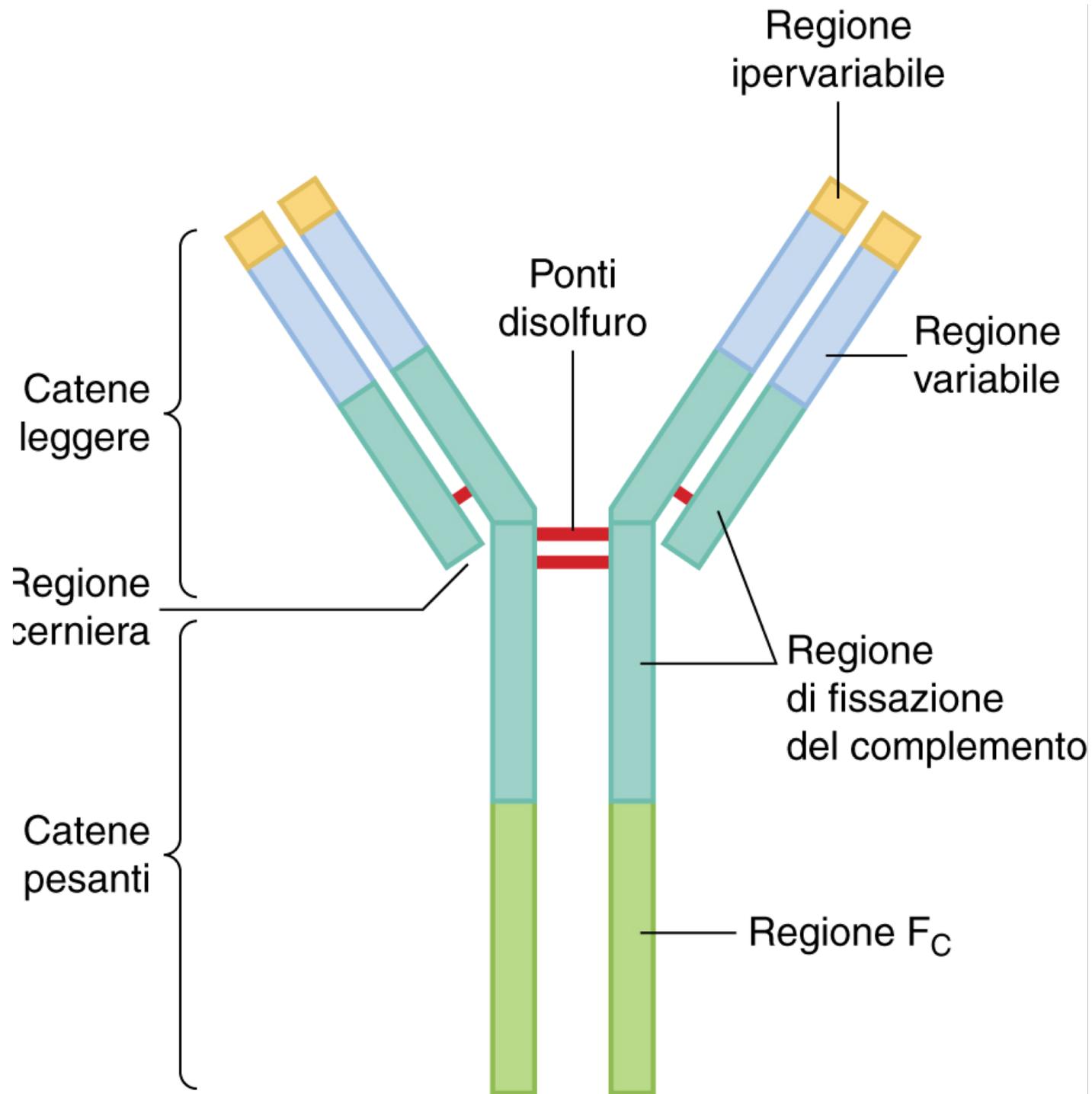
Meccanismi con cui gli anticorpi inducono gli effetti terapeutici



Azione citotossica mediata dal complemento (CDCC)



Azione citotossica mediata da cellule (ADCC)

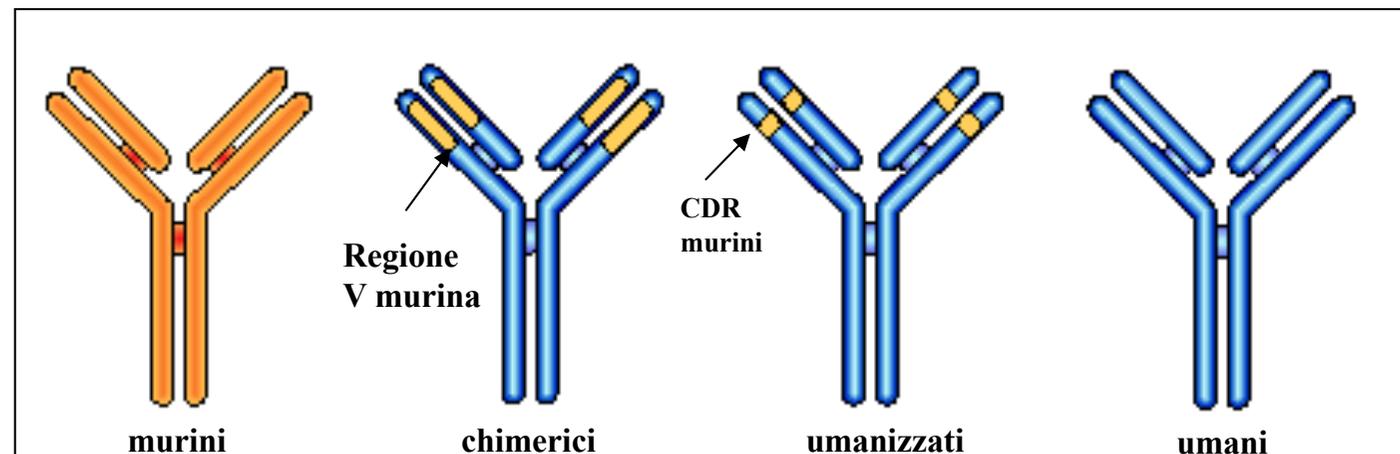


Il tentativo di generare anticorpi monoclonali umani impiegando la tecnologia dell'ibridoma non ha avuto pieno successo in quanto mancano linee cellulari di mieloma umano e gli ibridomi risultanti sono instabili.

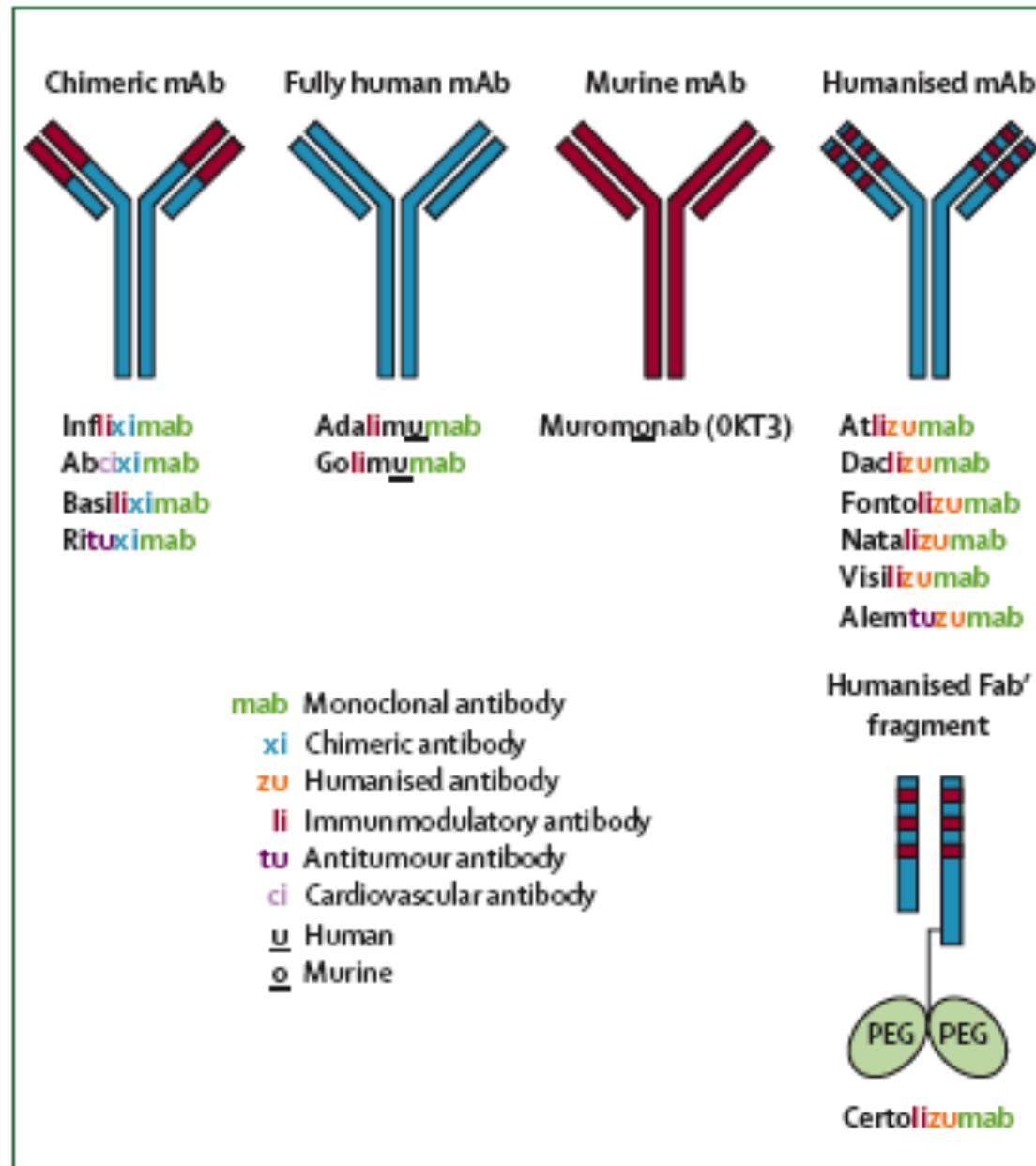
Negli ultimi 30 anni diversi approcci sono stati ideati in modo da "umanizzare" gli anticorpi murini.

- Anticorpi monoclonali murini mediante la tecnologia dell'ibridoma
- Anticorpi chimerici (70% DNA umano) e umanizzati (95% DNA umano)
- Anticorpi completamente umani, utilizzando animali transgenici con i loci delle immunoglobuline umane.

| | | | | |
|-----------------|-------|-------------|-------------|---------|
| Porzione umana | 0 | ~ 60 – 70 % | ~ 90 – 95 % | ~ 100 % |
| Porzione murina | 100 % | ~ 30 – 40 % | ~ 5 – 10 % | 0 |



Anticorpi monoclonali: nomenclatura



REAZIONI ANTI-ANTICORPO RIDUCONO L' EFFICACIA TERAPEUTICA

Le sequenze amminoacidiche nelle regioni costanti delle catene H dei frammenti Fc, sono le stesse in individui diversi della stessa specie, ma sono diverse in specie diverse; queste differenze sono responsabili delle reazioni immunitarie contro le immunoglobuline. Queste reazioni si presentano per esempio in pazienti che assumono per lungo tempo anticorpi contenenti le sequenze di immunoglobuline murine.

| | ANTICORPO | IMPIEGO | % |
|---------------------------------------|---------------|-------------------|-----|
| <i>Human anti-mouse antibodies</i> | { MUROMONAB | { RIGETTO ACUTO | ~50 |
| | | { LUPUS ER. SIST. | ~35 |
| <i>Human anti-chimeric antibodies</i> | { RITUXIMAB | { LINFOMA | ~1 |
| <i>Human anti-human antibodies</i> | { TRASTUZUMAB | { CANCRO SENO 0.1 | |
| | { DACLIZUMAB | { RIGETTO ACUTO | |

Queste reazioni:

- effetto avverso anche severo (pretrattamento con FANS ed anti-istaminici);
- interferiscono con la funzionalità e quindi l' efficacia degli anticorpi terapeutici;
- variano come incidenza in base alla malattia ed all' uso di altri farmaci.

(da "Pharmaceutical Biotechnology" - 2008)

Produzione di anticorpi murini umanizzati: anticorpi chimerici con sostituzione delle porzioni costanti

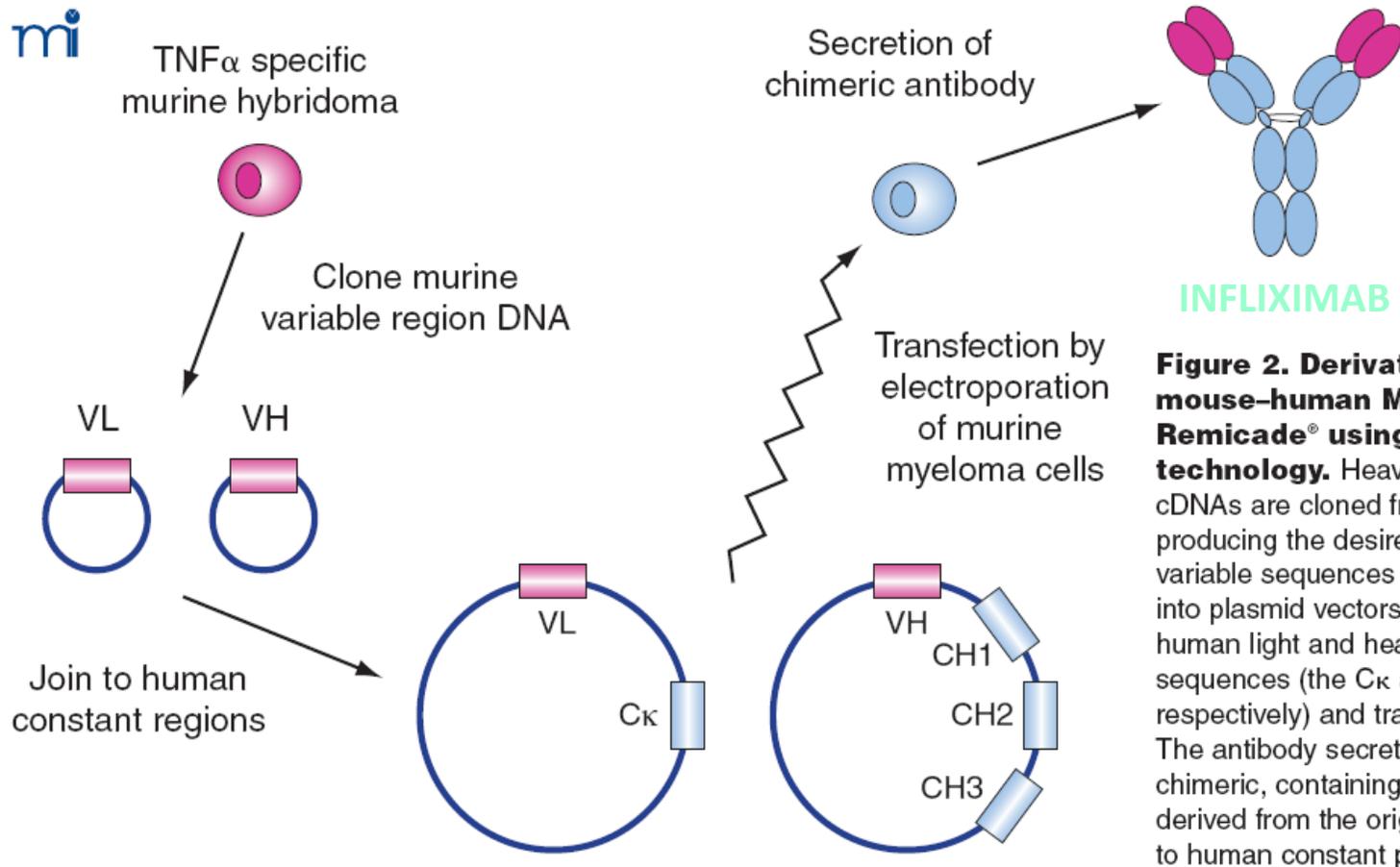


Figure 2. Derivation of chimeric mouse-human MABs such as Remicade[®] using recombinant DNA technology. Heavy and light chain variable cDNAs are cloned from a hybridoma cell clone producing the desired mouse MAb. These variable sequences (VL and VH) are inserted into plasmid vectors containing the desired human light and heavy chain constant domain sequences (the C κ and G1 CH1, CH2 and CH3, respectively) and transfected into myeloma cells. The antibody secreted by these cells is now chimeric, containing variable protein domain derived from the original mouse antibody fused to human constant protein domains.

Produzione anticorpi completamente umani

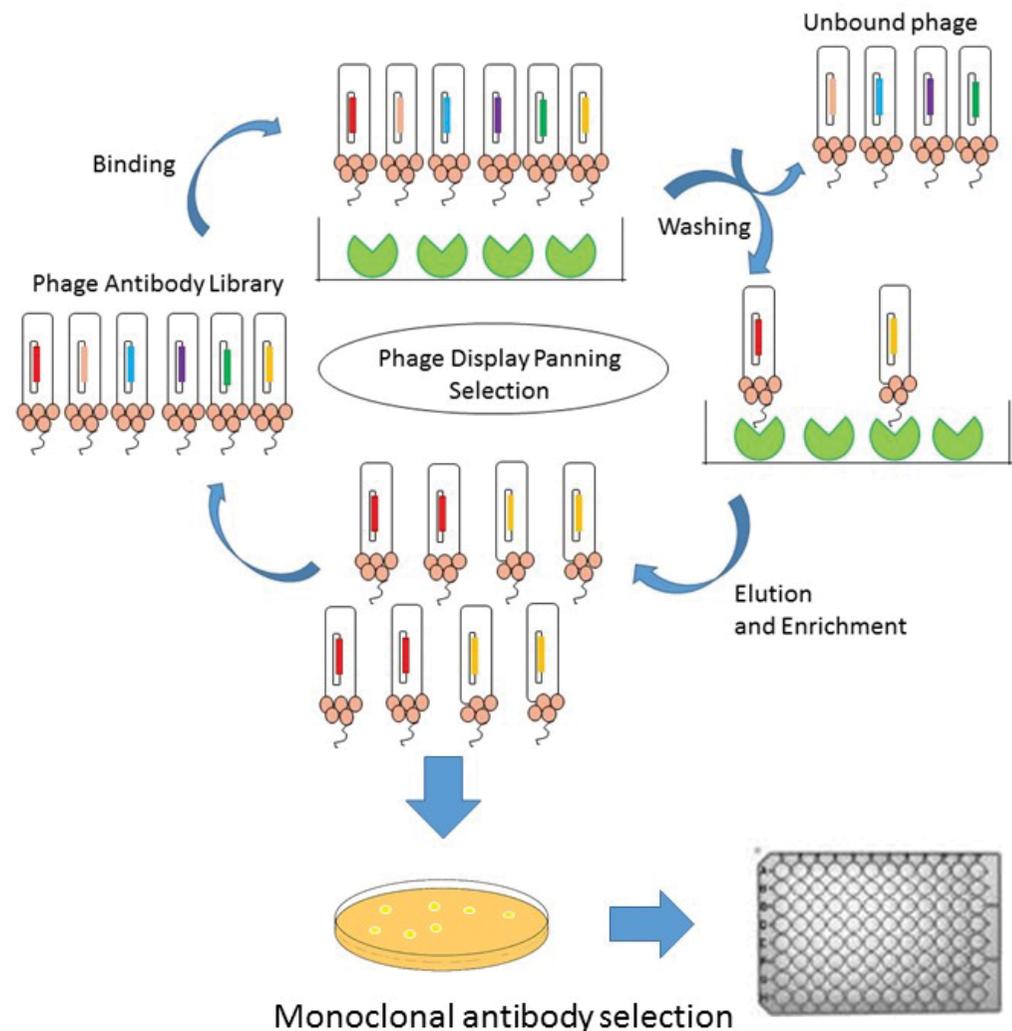
Possono essere prodotti impiegando due approcci:

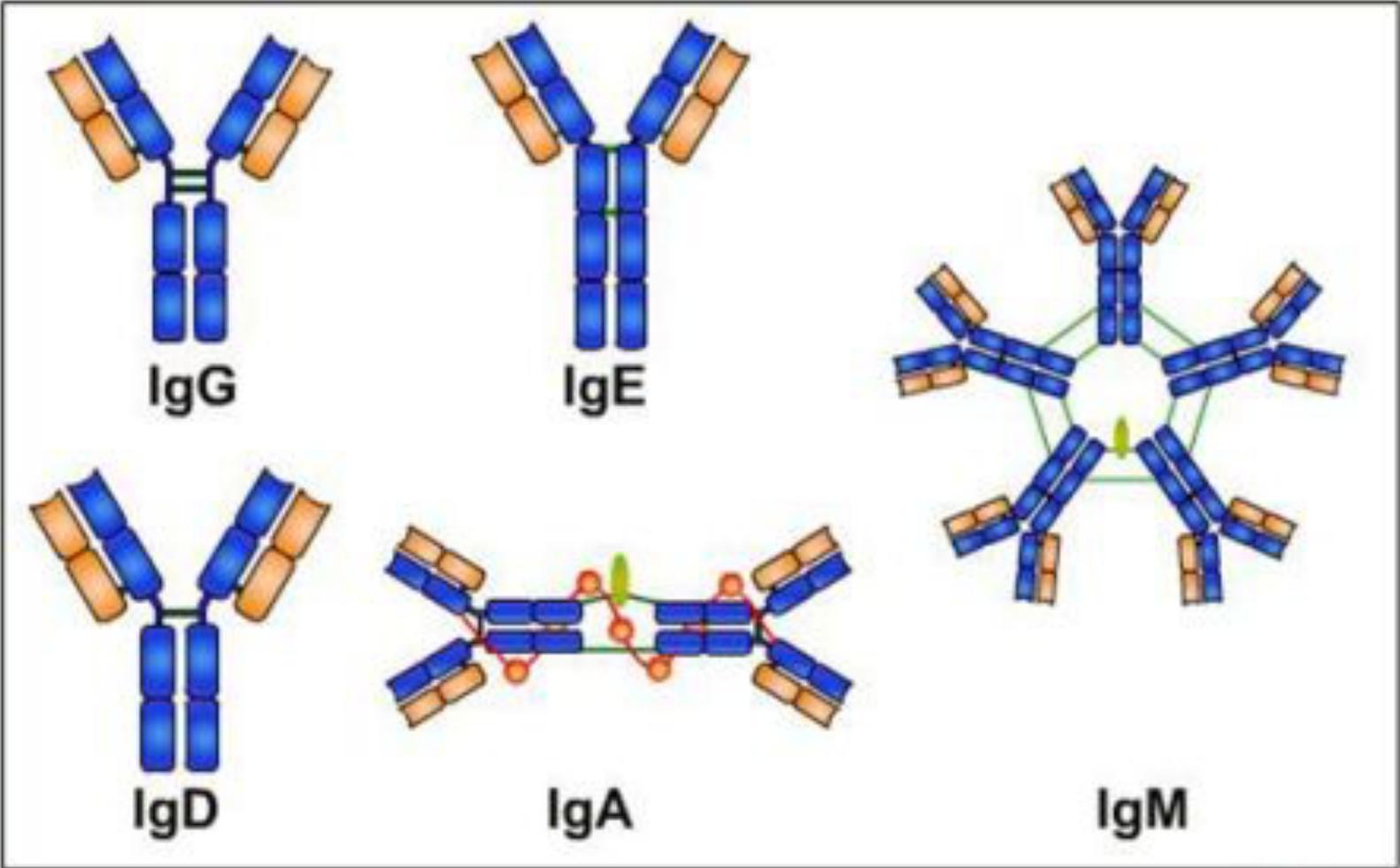
- phage display library (= adalimumab);
- topi transgenici (= panitumumab).

Phage display library

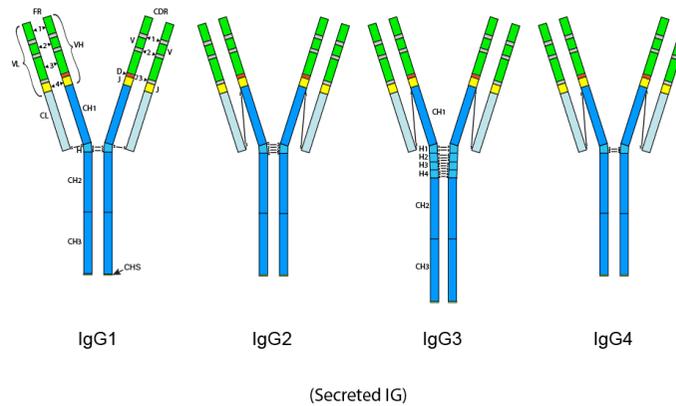
Impiega i fagi filamentosi per isolare geni sulla base dei loro prodotti proteici; inizialmente era utilizzata come tecnica di clonaggio per isolare geni per proteine di cui erano disponibili anticorpi specifici. Successivamente l'applicazione è stata invertita e la tecnica è impiegata per individuare anticorpi diretti contro proteine purificate.

ADALIMUMAB è un esempio di anticorpo umano prodotto con la tecnica del "phage display".





Human IgG class and subclasses



| IgG subclass | Percentage in serum | Half life (days) | Binding affinity for FcγRIIa | Complement activation |
|--------------|---------------------|------------------|------------------------------|-----------------------|
| IgG1 | 66 | ~21 | +++ | ++ |
| IgG2 | 23 | ~21 | +/- | + |
| IgG3 | 7 | ~7 | +++ | +++ |
| IgG4 | 4 | ~21 | + to - | - |

IgG1: la sottoclasse più utilizzata, soprattutto quando si vuole una citotossicità cellulo mediata (oncologia)

IgG2 e IgG4, non mediano la citotossicità, vengono scelti quando si vuole evitare la morte cellulare.

Piante transgeniche per la produzione di farmaci

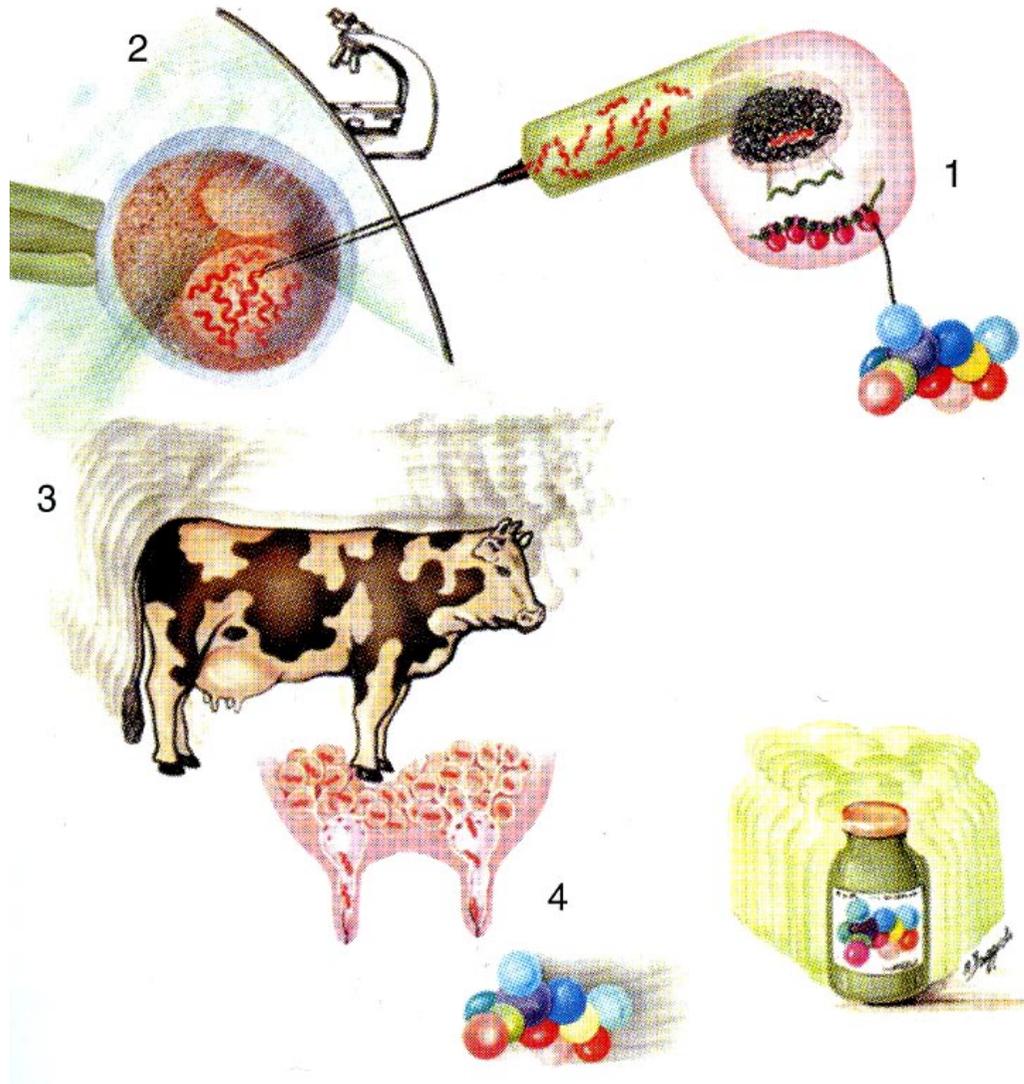


- Con la tecnica del DNA ricombinante è possibile fare esprimere nelle piante proteine quasi indistinguibili da quelle prodotte da cellule di mammifero
- Nelle cellule vegetali avviene una glicosilazione diversa e le proteine ricombinanti possono veicolare glucani vegetali che le rendono immunogeniche

| Nome | Formato | Specificità | Pianta | Proprietà | Stato di sperimentazione |
|-----------------|-------------------------------------|---|----------------------------|--|--------------------------|
| <i>Avicidin</i> | IgG | Molecola epiteliale di adesione cellulare (EpCAM) correlata al colon rettale | mais | NeoRx e Monsanto | Trial clinico fase II |
| <i>CaroRx</i> | Iga/IgG chimerica secretoria | Principale proteina di adesione dello Streptococcus mutans agente della carie | tabacco | St. George's Hospital Medical School, Londra | Trial clinico fase II |
| <i>T84.66</i> | IgG ScFv ScFv + interleukin-2 | Carcinoembryonic antigen (CEA), marcatore di carcinomi epiteliali | diverse | | Trial clinico fase II |
| <i>Anti-HSV</i> | IgG1 | Glicoproteina B dell'herpes simplex (HSV)-2 | soia | EpicYTE Pharmaceuticals | Trial clinico fase II |
| <i>Anti-RSV</i> | IgG | Proteina R9 del virus respiratorio sinciziale (RSV) | soia | EpicYTE Pharmaceuticals | Trial clinico fase II |
| <i>38C13</i> | scFv | Idiotipo di linfociti B maligni (da cellule di linfoma linea 38C13) | piante infettate con virus | Large Scale Biology | Trial clinico fase I |
| <i>PIPP</i> | IgG | Gonadotropina corionica umana (hCG) Per terapia e diagnosi di tumori che producono hCG, test di gravidanza e contraccezione. | tabacco | | Trial clinico fase I |

IN CLINICAL TRIALS

Animali transgenici per la produzione di farmaci: *gene farming*



1. Un gene che consente la produzione di una determinata molecola (ad es un composto ad attività farmacologica) viene isolato e amplificato
2. Microiniettato in un uovo fecondato bovino, il gene si inserisce nel patrimonio genetico
3. Individui così modificati potranno essere replicati mediante la clonazione
4. È possibile far esprimere il gene in un organo specifico (mammella) e al momento prestabilito, in modo da far produrre il farmaco nel latte



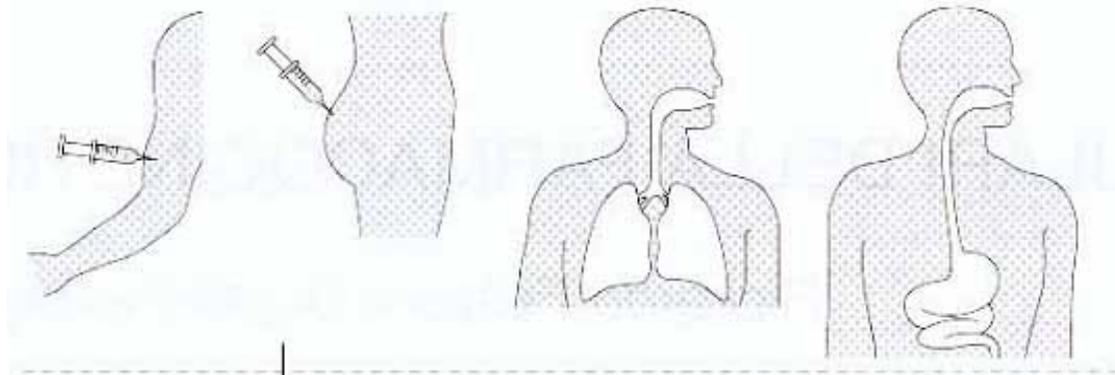
- Agosto 2006: l'EMA approva Atryn, alfa-antitrombina umana prodotta nel latte da capre transgeniche
- Il farmaco è stato approvato per la profilassi della trombosi venosa profonda e della tromboembolia in pazienti con deficit congenito di antitrombina.
- L'immissione in commercio è approvata esclusivamente per "circostanze eccezionali", assicurandosi che la ditta produttrice ne controlli rigorosamente la sicurezza.

Animali transgenici per la produzione di farmaci: *gene farming*

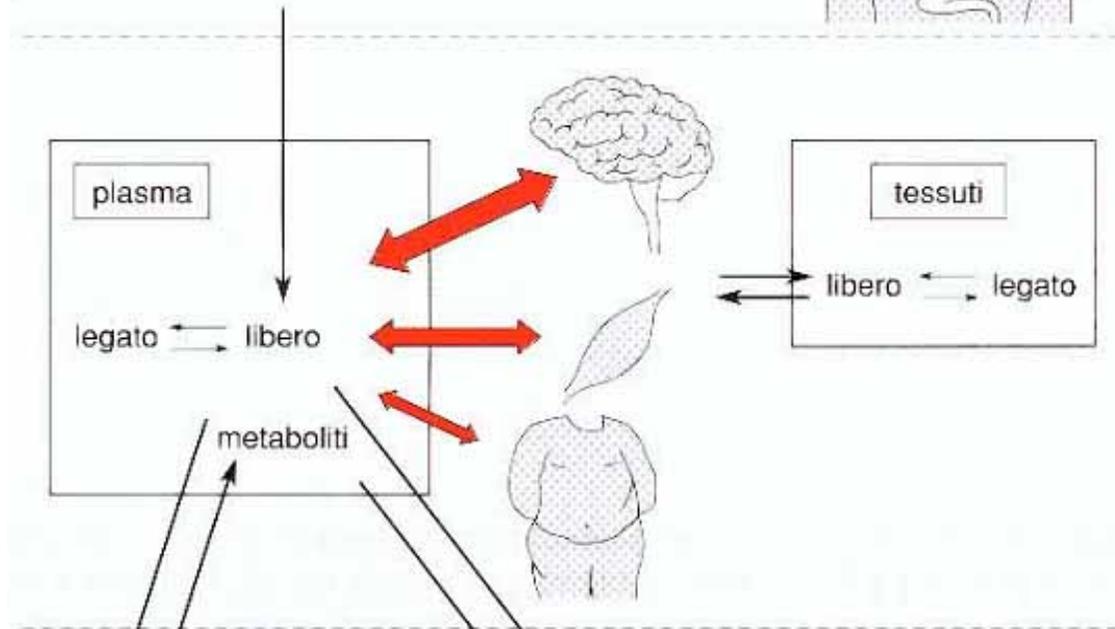
| Prodotto | Società produttrice | Applicazione |
|---|---------------------|--|
| LATTE DI PECORA | | |
| α_1 -antitripsina umana | PPL, UK | Terapia dell'enfisema |
| Proteina C umana | PPL, UK | Terapia della trombosi |
| Fattori VIII e IX della coagulazione umani | PPL, UK | Terapia dell'emofilia |
| LATTE DI BOVINA | | |
| Lattoferrina umana | Genzyme, MA, USA | Trasporto del ferro e attività antibatterica |
| LATTE DI CAPRA | | |
| Attivatore tissutale del plasminogeno umano | Genzyme, MA, USA | Dissoluzione dei trombi |
| PLASMA DI SUINO | | |
| Emoglobina umana | DNX, NJ, USA | Sostituto del plasma nelle trasfusioni |

Farmacocinetica

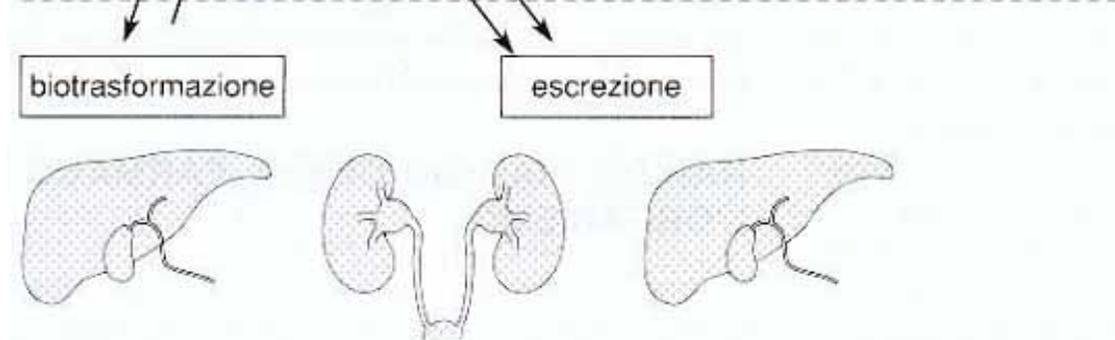
assorbimento



distribuzione



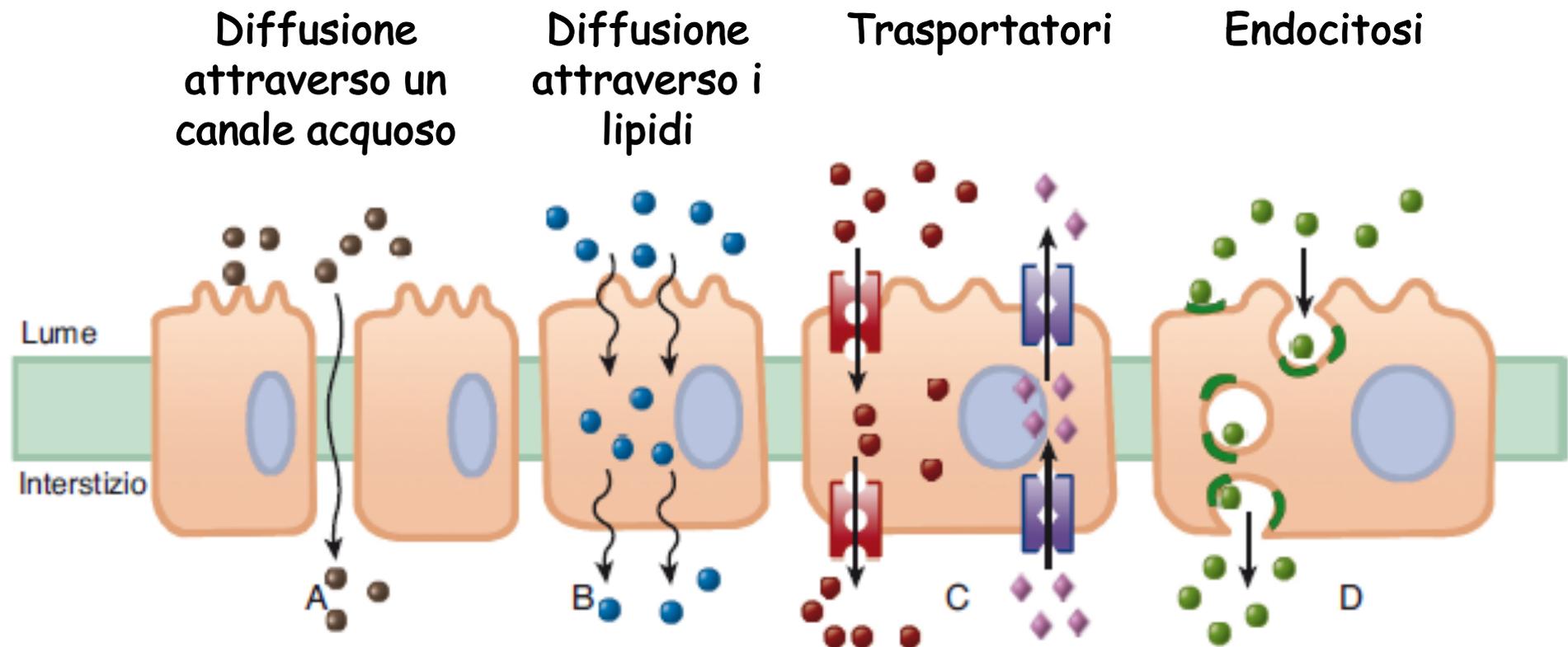
eliminazione



La complessità delle proteine

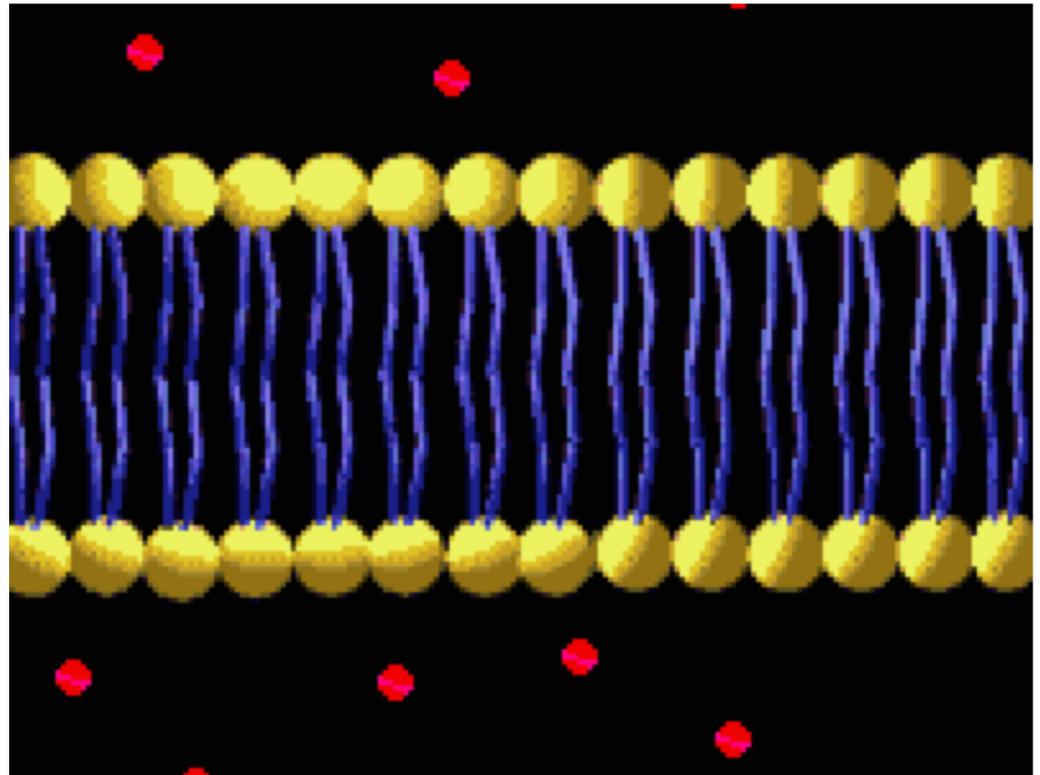
- Strutture molto **grandi e instabili**
- Struttura che si mantiene conformata con **forze di legame molto deboli**
- **Facile denaturazione** anche in condizioni non aggressive
- **Facilmente eliminate e distrutte dall'organismo**

Passaggio dei farmaci attraverso le membrane cellulari



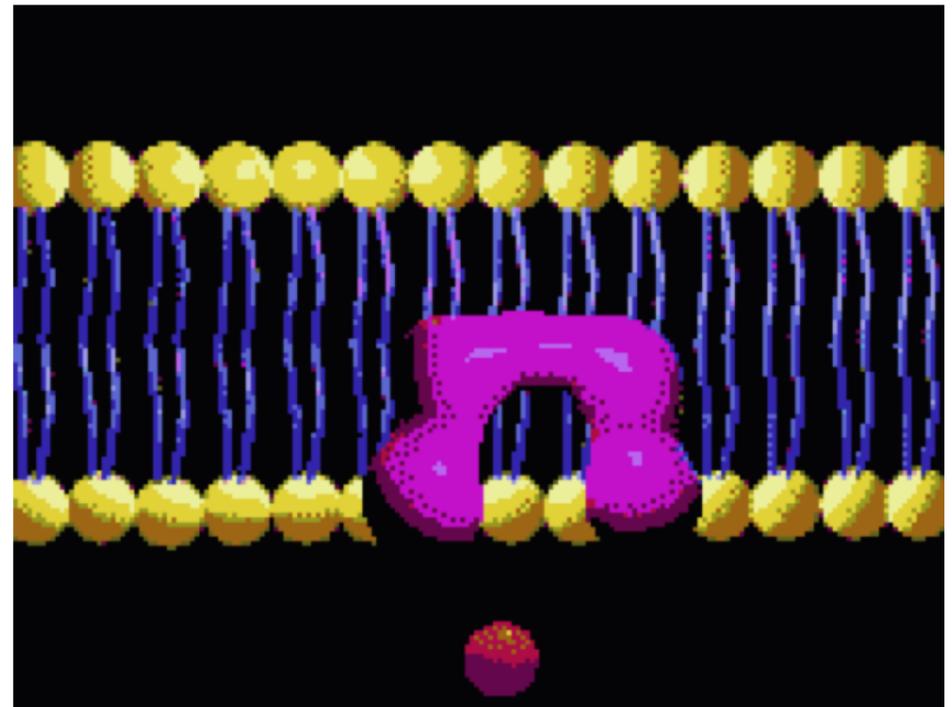
Diffusione semplice

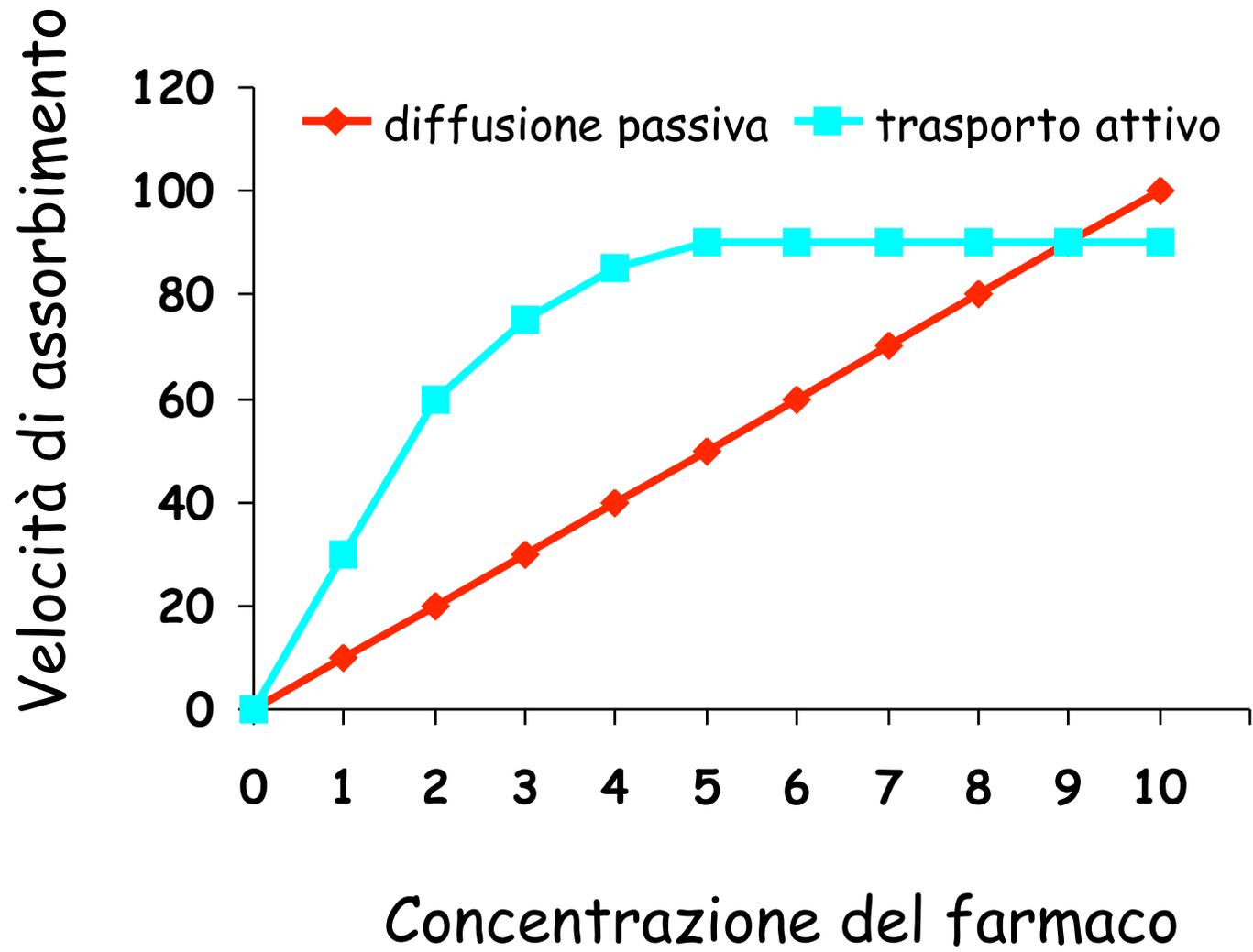
- È la modalità più frequente di passaggio dei farmaci attraverso le membrane
- non richiede consumo di energia
- non è selettiva
- è tanto più rapida e completa quanto più il farmaco è liposolubile



Trasporto attivo

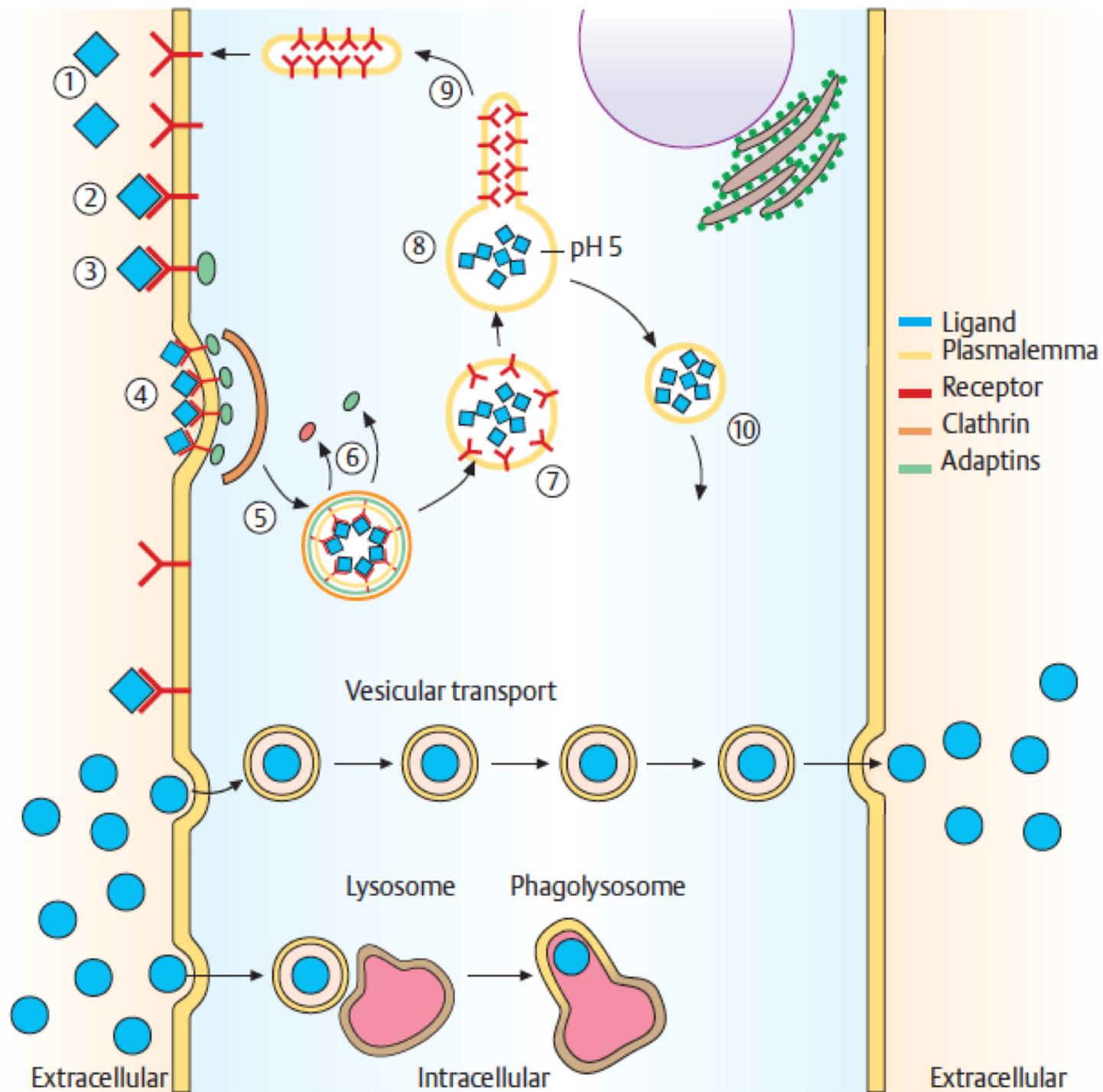
- È mediato da un carrier
- trasporta farmaci che sono analoghi di sostanze endogene (5-fluorouracile, l-dopa)
- trasporta contro gradiente e consuma energia
- è altamente selettivo ma molecole simili possono competere
- è saturabile

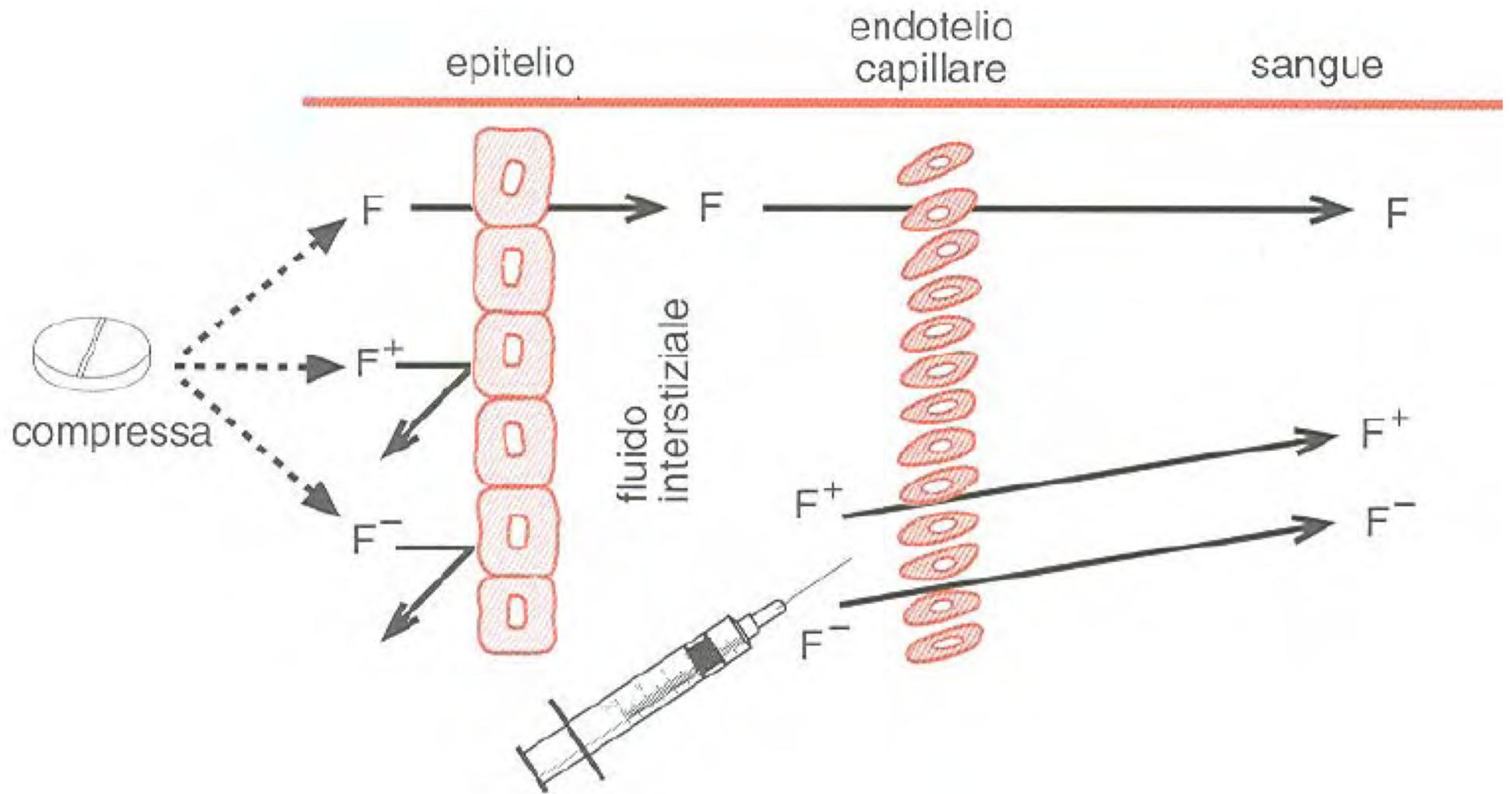




Endocitosi

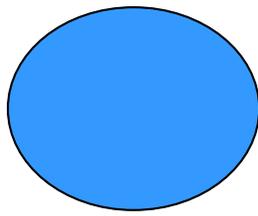
- Processo per cui porzioni di membrana cellulare, introflettendosi e chiudendosi su se stesse, si trasformano in vescicole intracellulari nelle quali rimangono intrappolati:
 1. Componenti della membrana stessa
 2. Sostanze dissolte nei fluidi extracellulari (fluid phase endocytosis)
 3. Sostanze legate ai componenti della membrana endocitata (receptor mediated endocytosis)





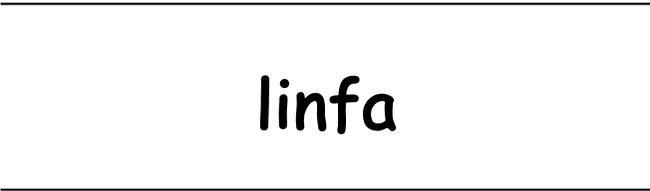


Farmaci a basso PM



Sito di iniezione

Farmaci ad alto PM



linfa

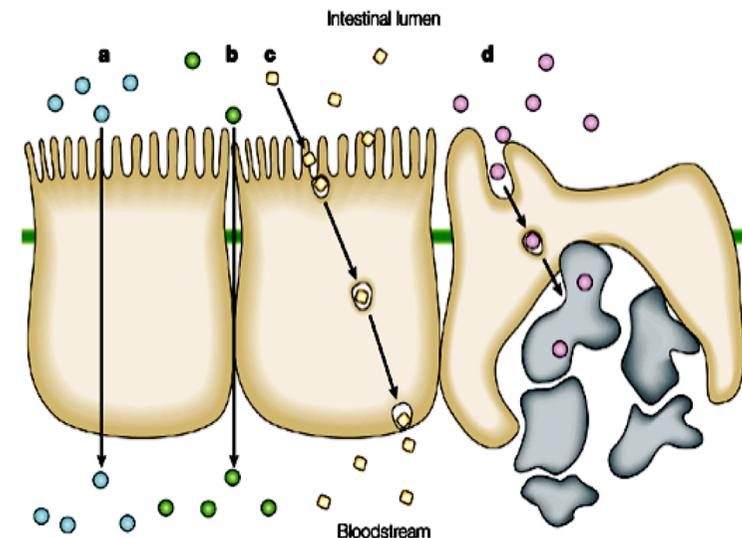
Farmacocinetica dei farmaci proteici e peptidici: **assorbimento**

Cause della scarsa biodisponibilità orale dei farmaci proteici e peptidici

- Degradazione nel tratto gastrointestinale : pepsine (stomaco), tripsina, chimotripsina, elastasi, carbossipeptidasi A e B (tenue), proteasi citoplasmatiche e di membrana degli enterociti
- Scarsa permeabilità

Metodi per migliorare la biodisponibilità orale delle proteine

- Diminuire l'attività peptidasica nel tubo gastroenterico:
 - aprotinina, bacitracina, inibitore della tirosina di soia, borolcucina, borovalina
- Migliorare la resistenza alla degradazione modificando la struttura molecolare
- Aumentare la permeabilità della barriera all'assorbimento:
 - aggiunta di acidi grassi/fosfolipidi, sali biliari, detergenti non ionici a struttura di estere e di etere, saponine, β -ciclodestrine metilate
 - con l'impiego di liposomi
- Prolungare il tempo di esposizione (per esempio, tecnologie di bioadesione)



Vie di somministrazione dei farmaci proteici

- Endovenosa (infliximab Remicade®...)
- Intramuscolare
- Sottocutanea (anakinra Kineret®, etanercept Enbrel®, adalimumab Humira®, insuline...)
- Intravitreale (ranibizumab Lucentis®, bevacizumab Avastin)
- Le proteine somministrate per via s.c. vengono assorbite attraverso i capillari se piccole, attraverso i vasi linfatici se più grandi (> 16 kDa)

■TABLE 5.7. Some dosage formulations and sites used in administration of biopharmaceuticals

| Route of Administration | Dosage Formulation | Examples |
|--|--|--|
| Parenteral Intravenous, Intraarterial, Intracardiac, Intraspinal or Intrathecal, Intramuscular, Intrasynovial, Intracutaneous or Intradermal, Subcutaneous | Solutions, Suspensions, Lyophilized powders to be reconstituted into solution | Blood clotting factors, colony-stimulating factors, antibodies and derivatives, interferons, interleukins, enzymes, hormones, vaccines |
| Local injection | Solutions | Interferon for direct injection into wart |
| Intrarespiratory | Aerosols | DNase delivered to lungs to reduce mucus accumulation |
| Topical | Gels | Platelet-derived growth factor for wound healing |
| Intranasal | Solutions | Calcitonin for Paget's disease; gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist for management of endometriosis |
| Intravitreal | Solutions | Antisense nucleotide polymer against CMV retinitis in patients with AIDS |