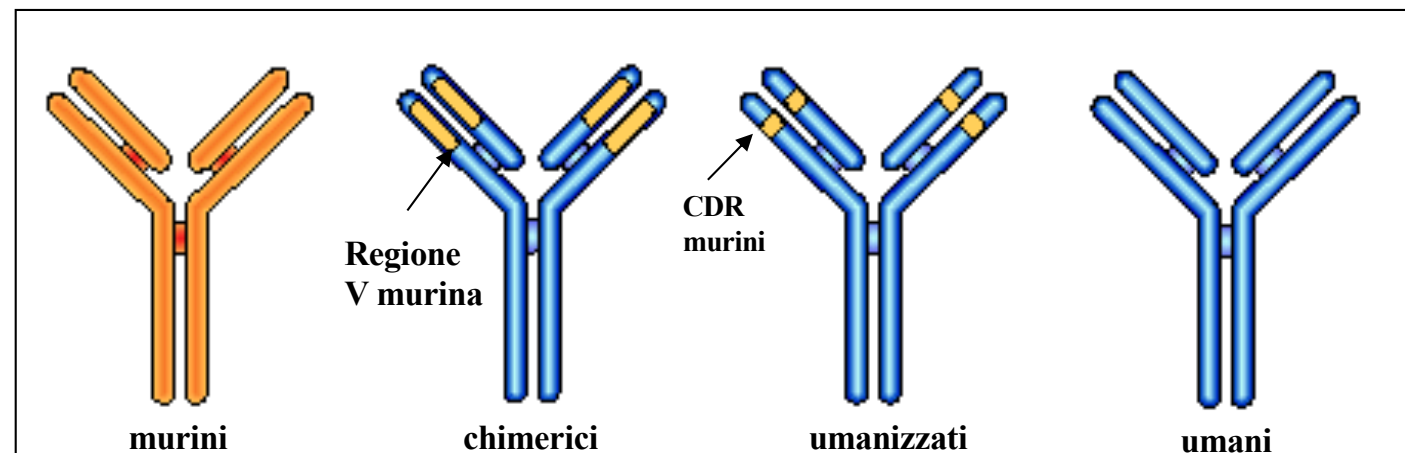


Il tentativo di generare anticorpi monoclonali umani impiegando la tecnologia dell'ibridoma non ha avuto pieno successo in quanto mancano linee cellulari di mieloma umano e gli ibridomi risultanti sono instabili.

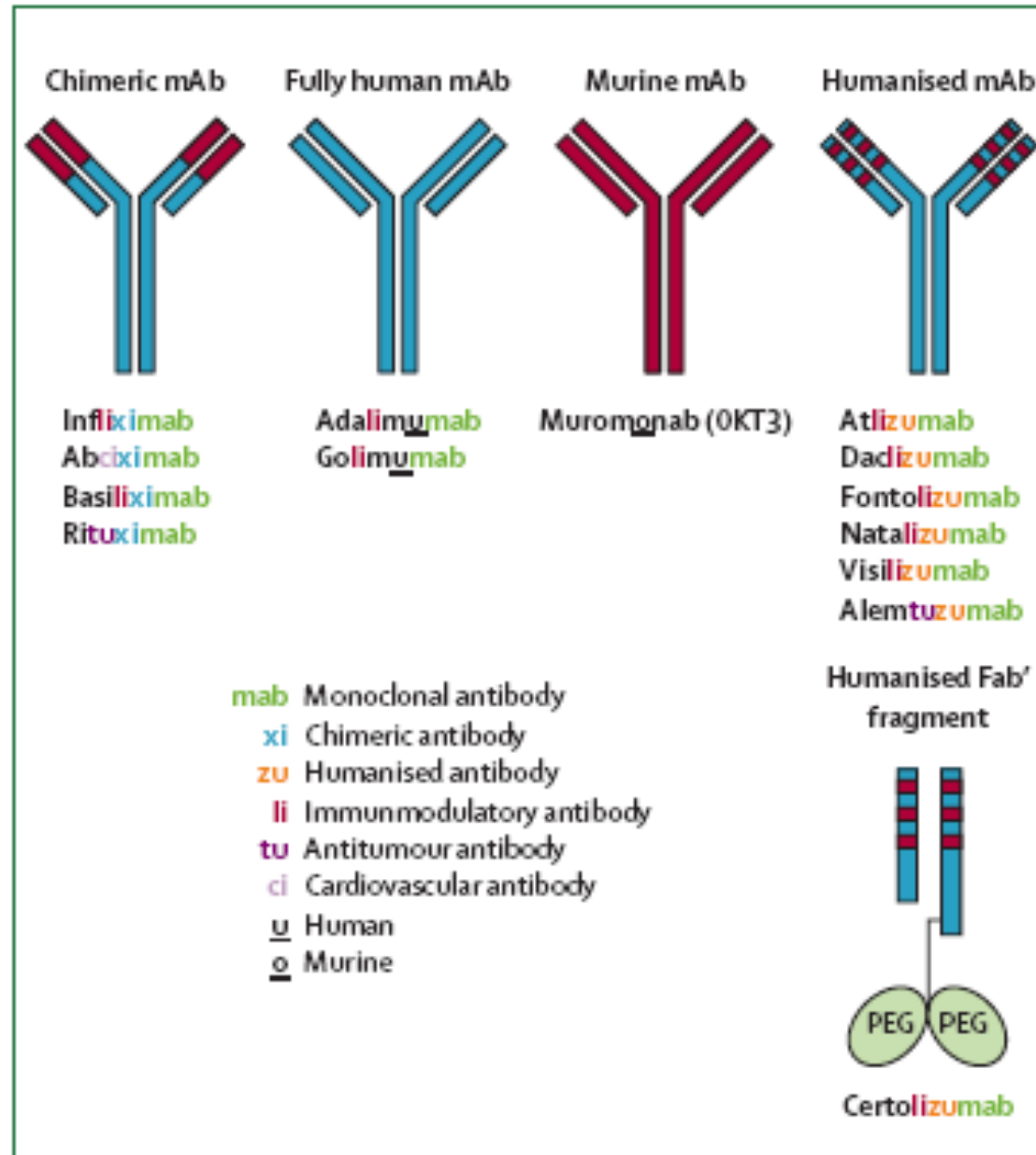
Negli ultimi 30 anni diversi approcci sono stati ideati in modo da "umanizzare" gli anticorpi murini.

- 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.

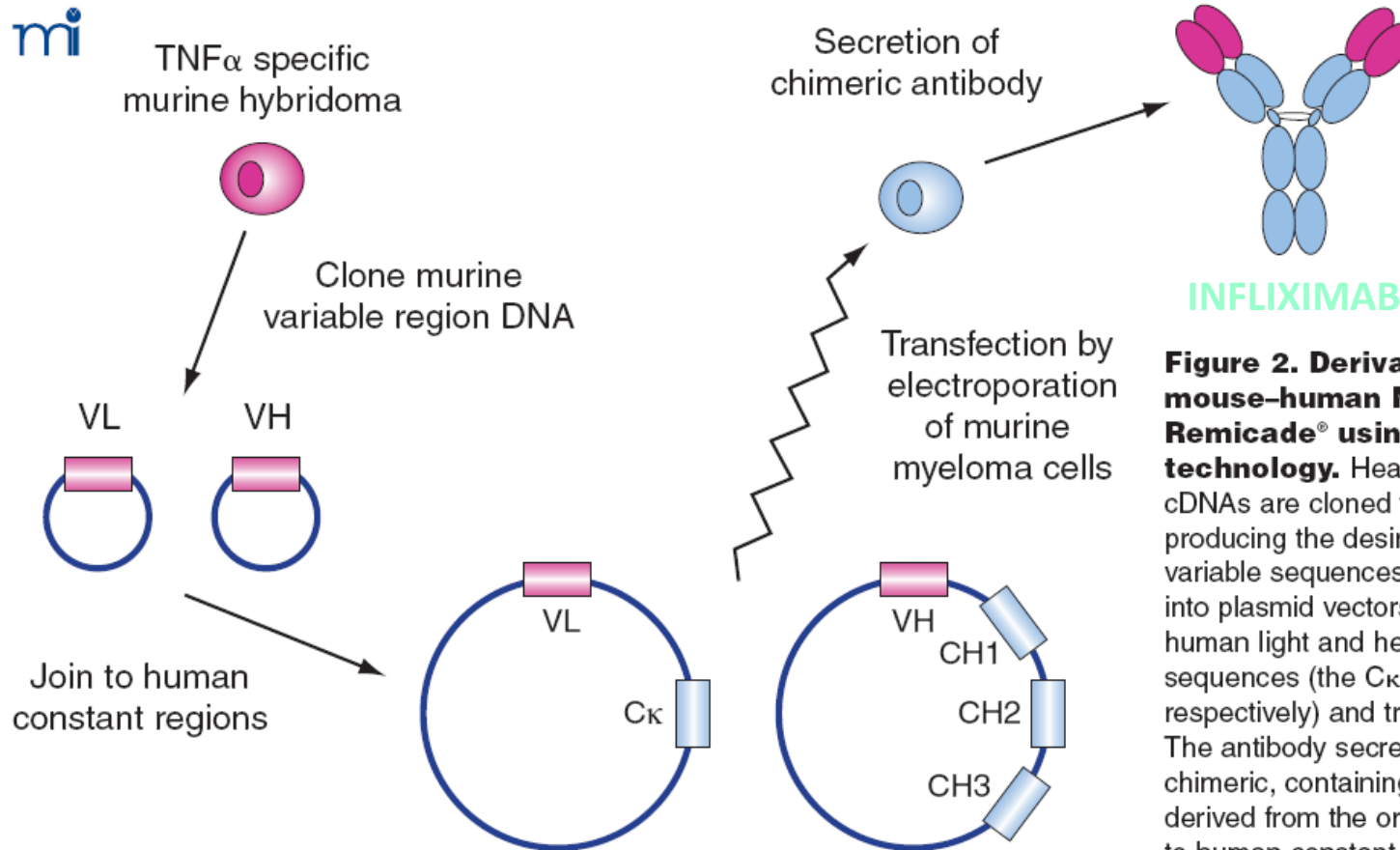
	<b>ANTICORPO</b>	<b>IMPIEGO</b>	<b>%</b>
<i>Human anti-mouse antibodies</i>	{ MUROMONAB	{ RIGETTO ACUTO	~50
		{ LUPUS ER. SIST.	~35
<i>Human anti-chimeric antibodies</i>	{ RITUXIMAB	{ LINFOMA	~1
<i>Human anti-human antibodies</i>	{ TRASTUZUMAB	{ CANCRO SENO 0.1	
	{ DACLIZUMAB	{ RIGETTO ACUTO	

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<sup>®</sup> 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 $\kappa$  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

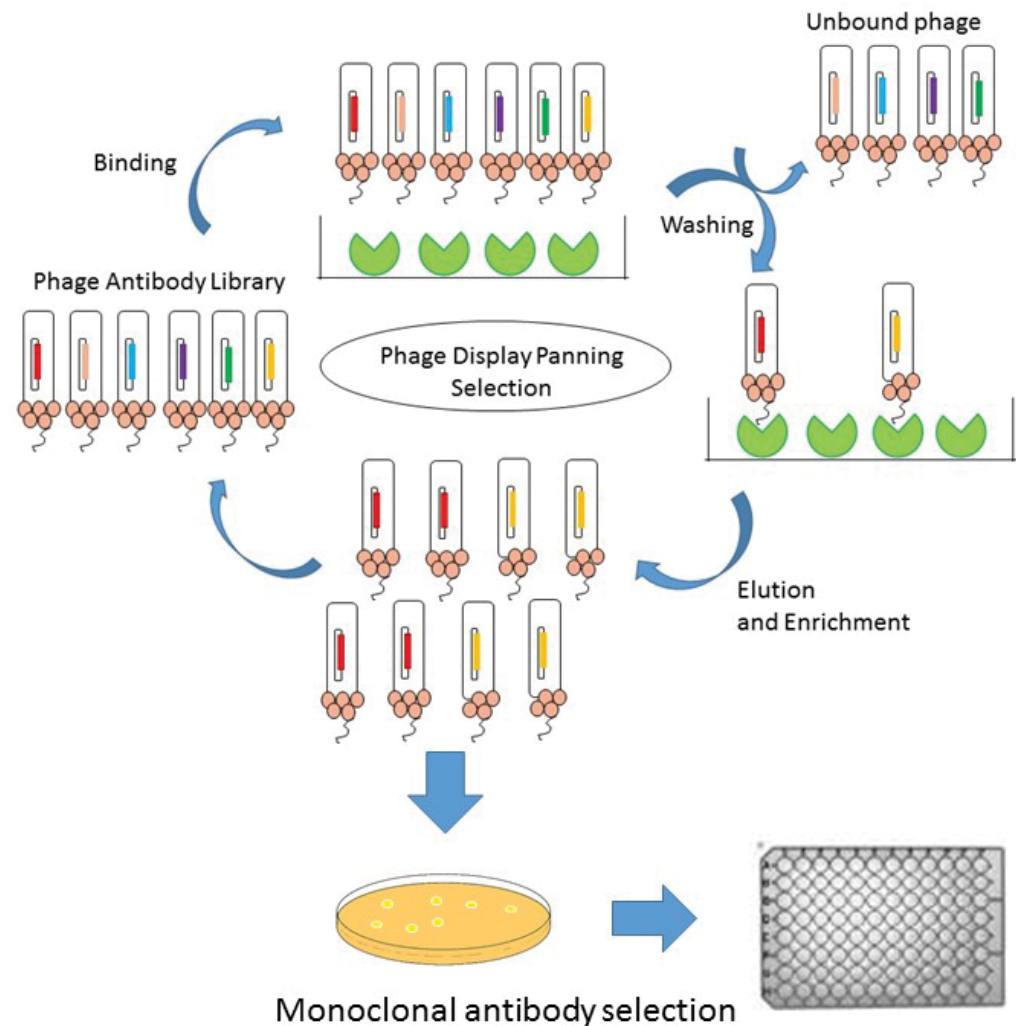
Possono essere prodotti impiegando due approcci:

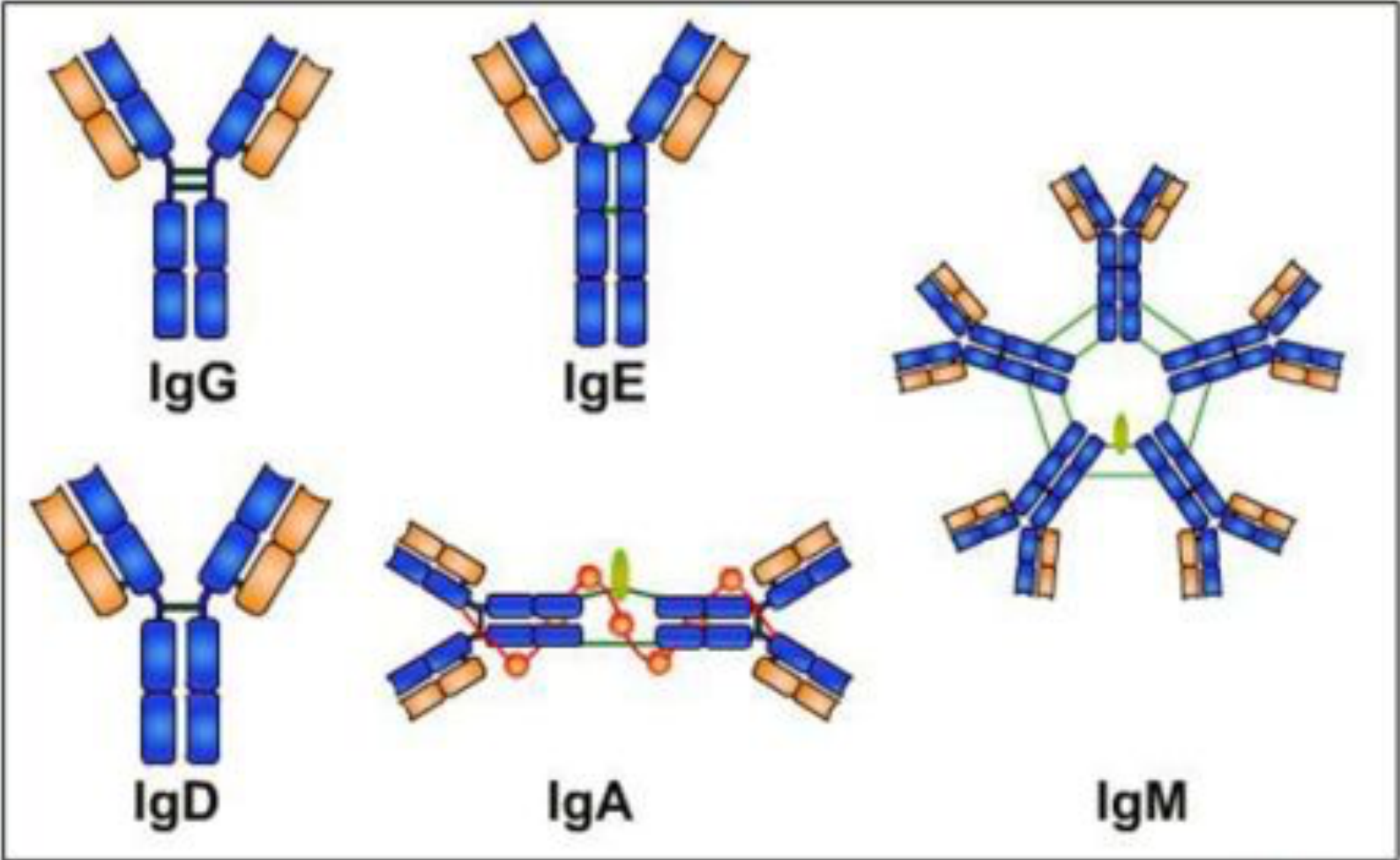
- phage display library (= adalimumab);
- topi transgenici (= panitumumab).

## 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.

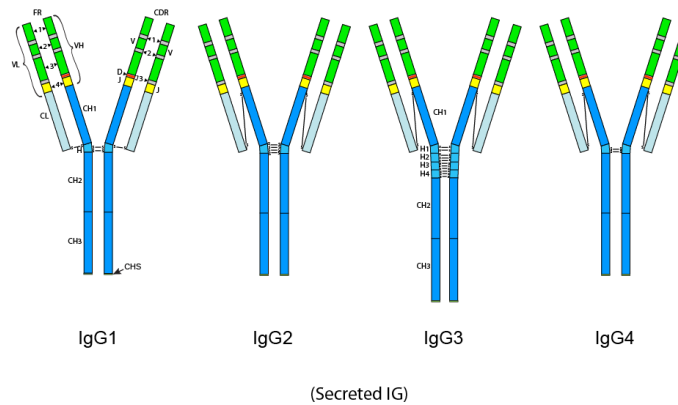
**ADALIMUMAB** è un esempio di anticorpo umano prodotto con la tecnica del "phage display".







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

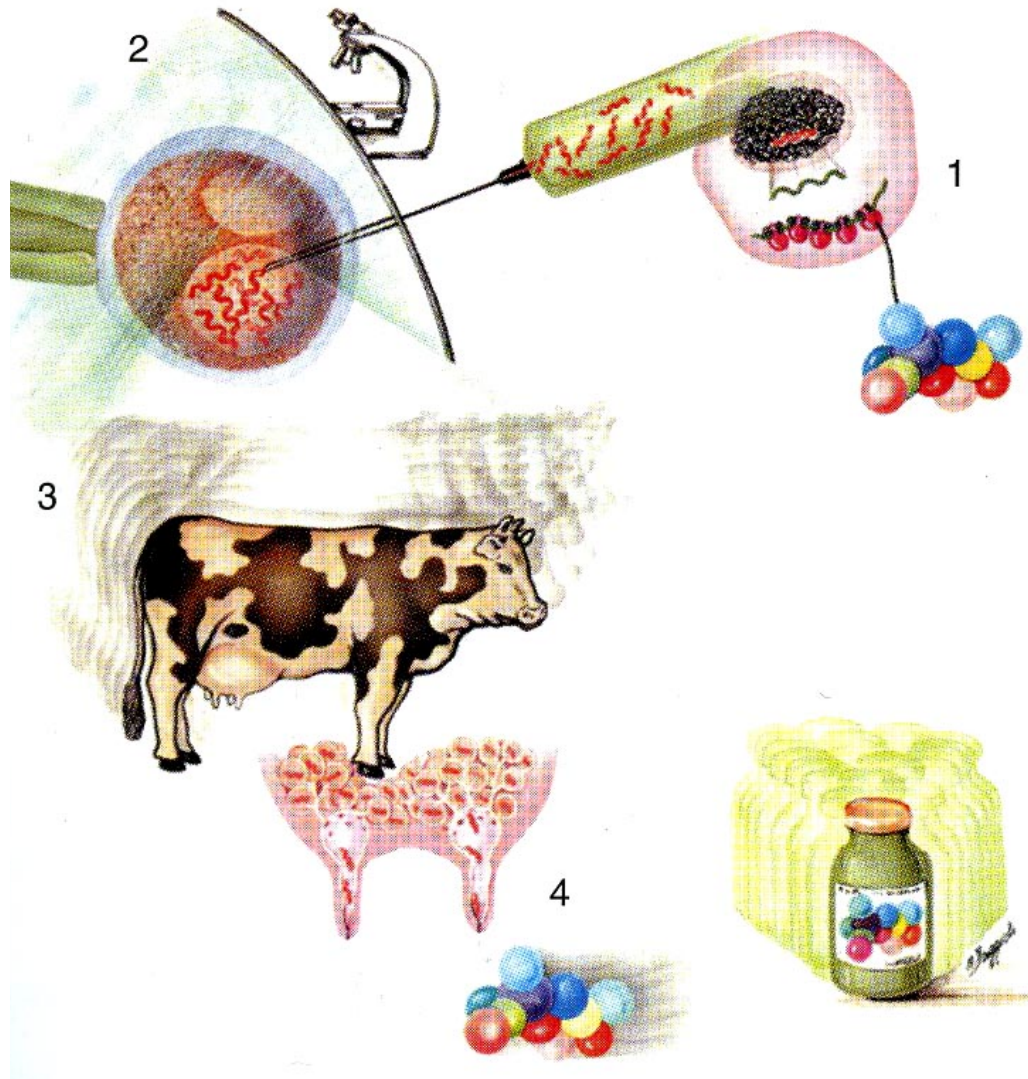


- Con la tecnica del DNA ricombinante è possibile fare esprimere nelle piante proteine quasi indistinguibili da quelle prodotte da cellule di mammifero
- Nelle cellule vegetali avviene una glicosilazione diversa e le proteine ricombinanti possono veicolare glucani vegetali che le rendono immunogeniche

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



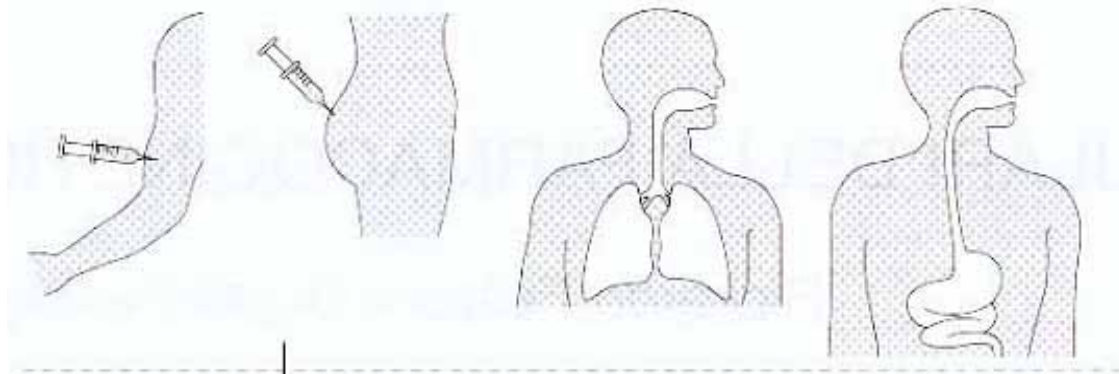
- Agosto 2006: l'EMA approva Atryn, alfa-antitrombina umana prodotta nel latte da capre transgeniche
- Il farmaco è stato approvato per la profilassi della trombosi venosa profonda e della tromboembolia in pazienti con deficit congenito di antitrombina.
- L'immissione in commercio è approvata esclusivamente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

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

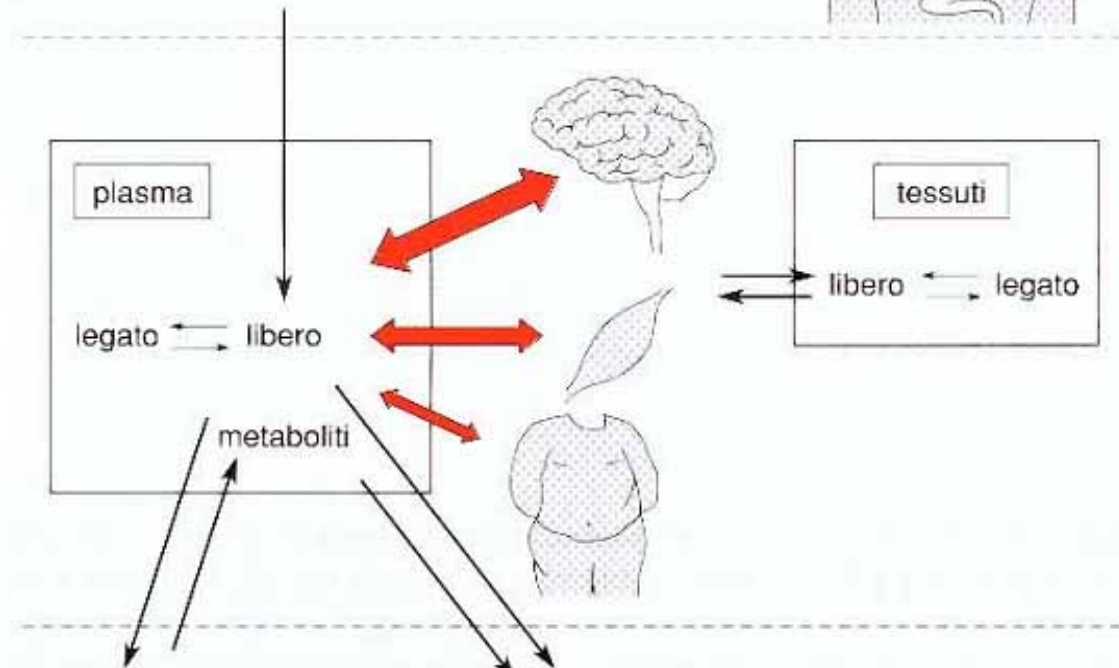
Prodotto	Società produttrice	Applicazione
LATTE DI PECORA		
$\alpha_1$ -antitripsina umana	PPL, UK	Terapia dell'enfisema
Proteina C umana	PPL, UK	Terapia della trombosi
Fattori VIII e IX della coagulazione umani	PPL, UK	Terapia dell'emofilia
LATTE DI BOVINA		
Lattoferrina umana	Genzyme, MA, USA	Trasporto 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

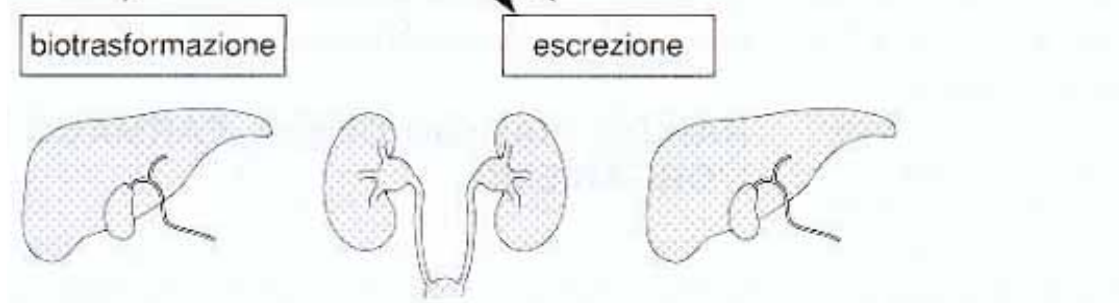
assorbimento



distribuzione



eliminazione

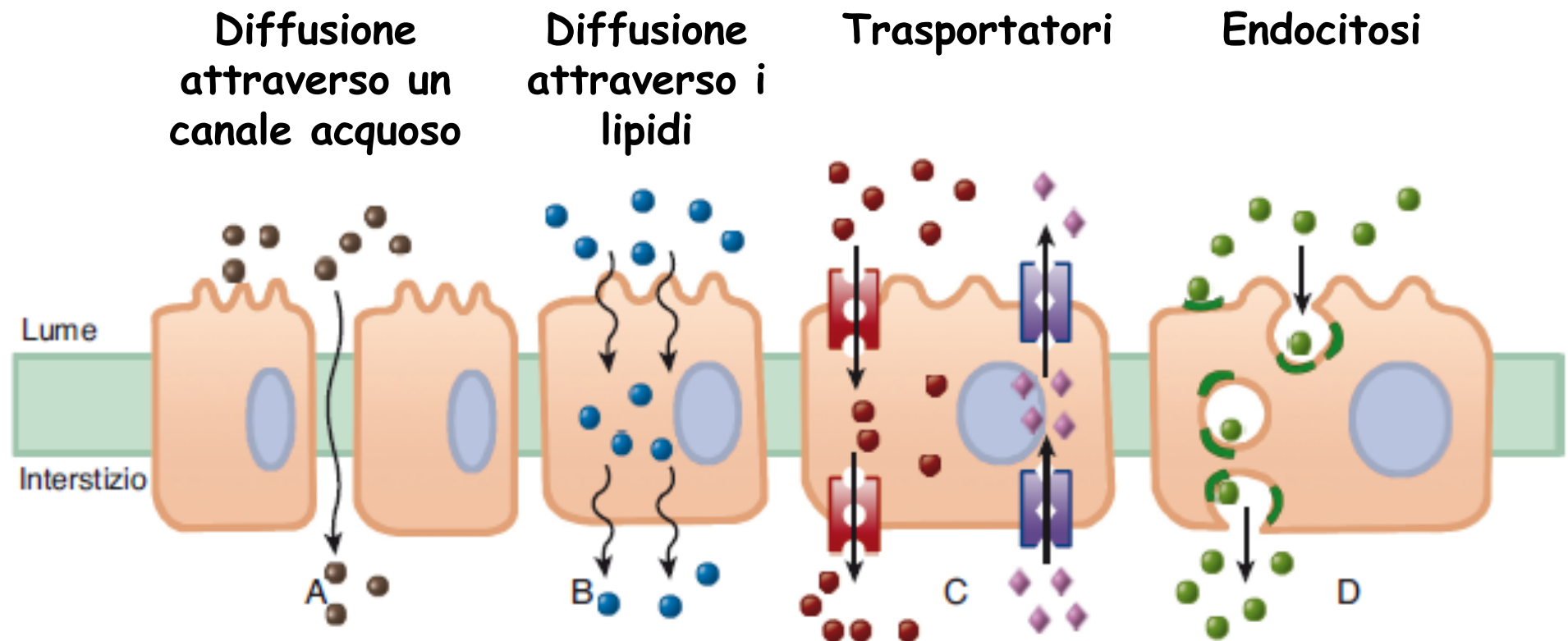


# La complessità delle proteine

- 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**

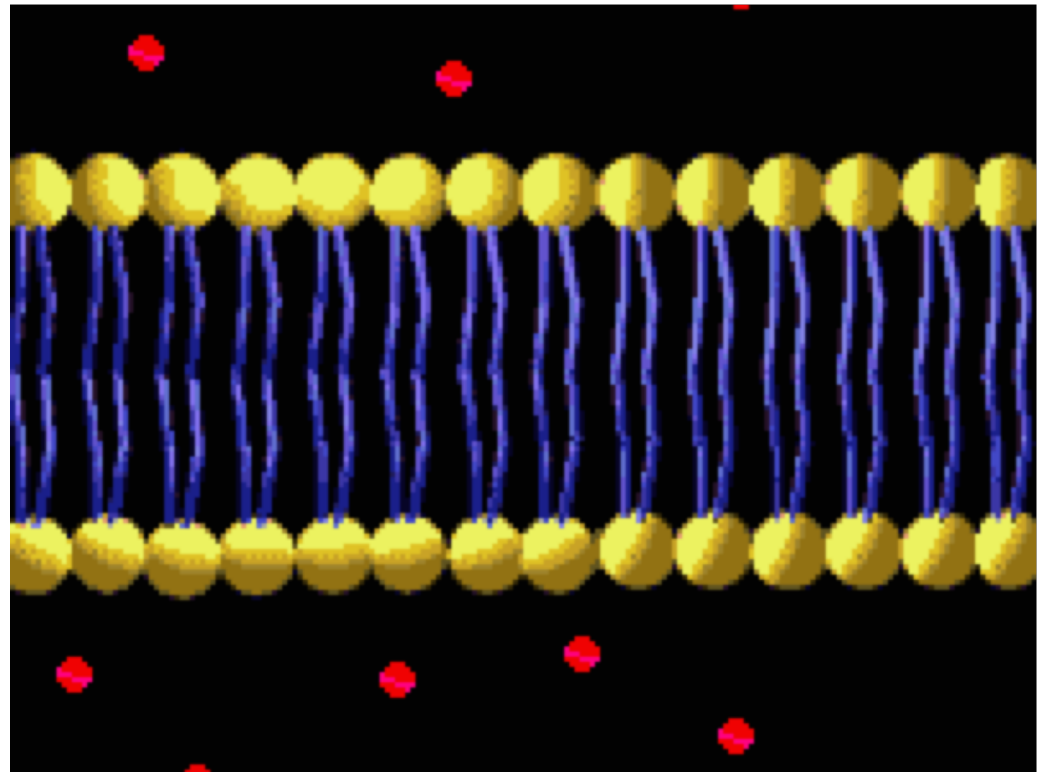


# Passaggio dei farmaci attraverso le membrane cellulari



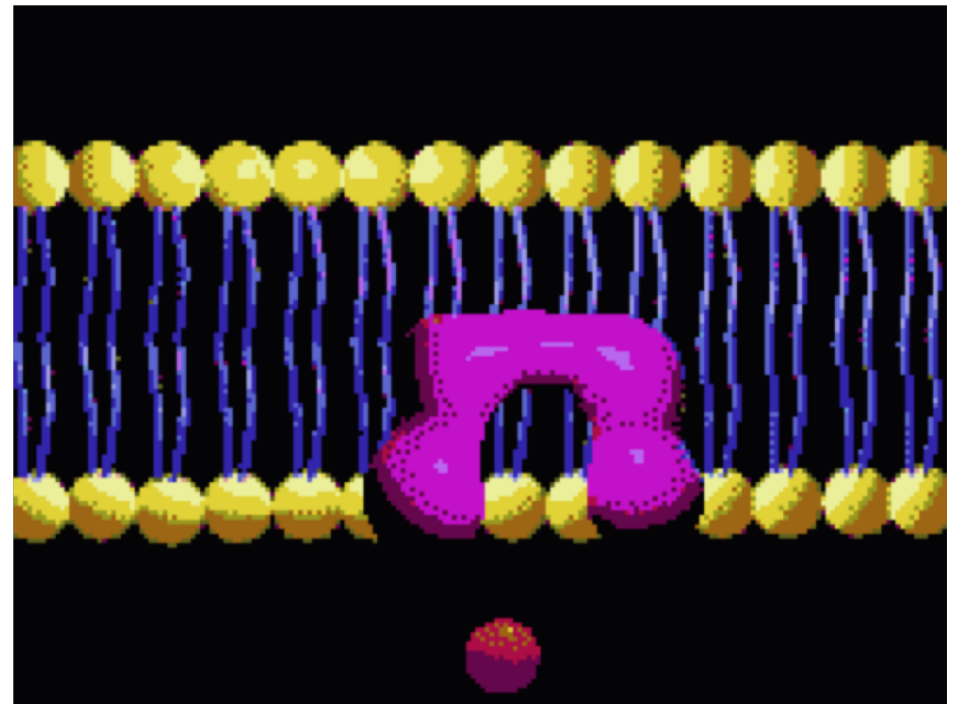
# Diffusione semplice

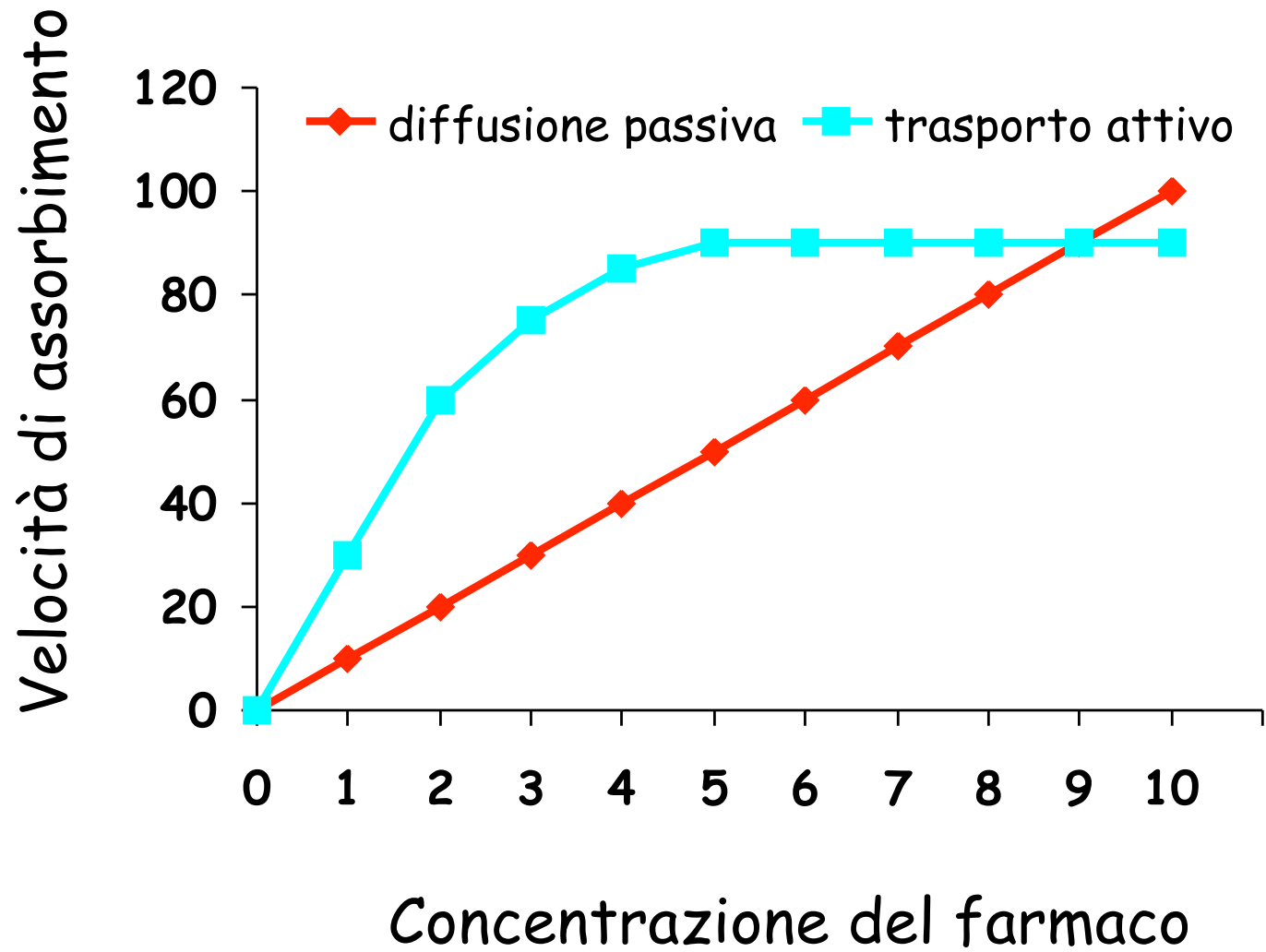
- È la modalità più frequente di passaggio dei farmaci attraverso le membrane
- non richiede consumo di energia
- non è selettiva
- è tanto più rapida e completa quanto più il farmaco è liposolubile



# Trasporto attivo

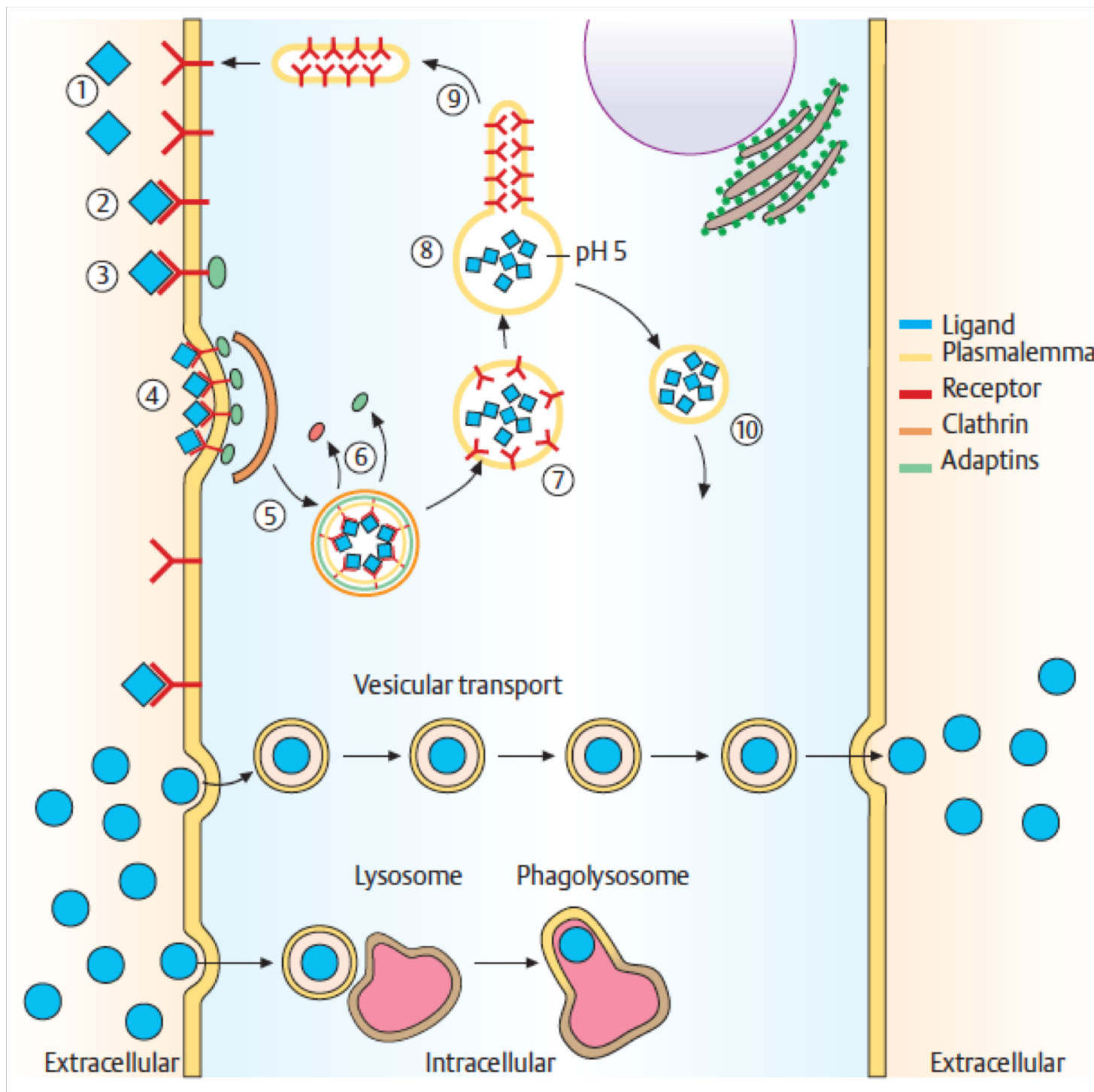
- È mediato da un carrier
- trasporta farmaci che sono analoghi di sostanze endogene (5-fluorouracile, l-dopa)
- trasporta contro gradiente e consuma energia
- è altamente selettivo ma molecole simili possono competere
- è saturabile

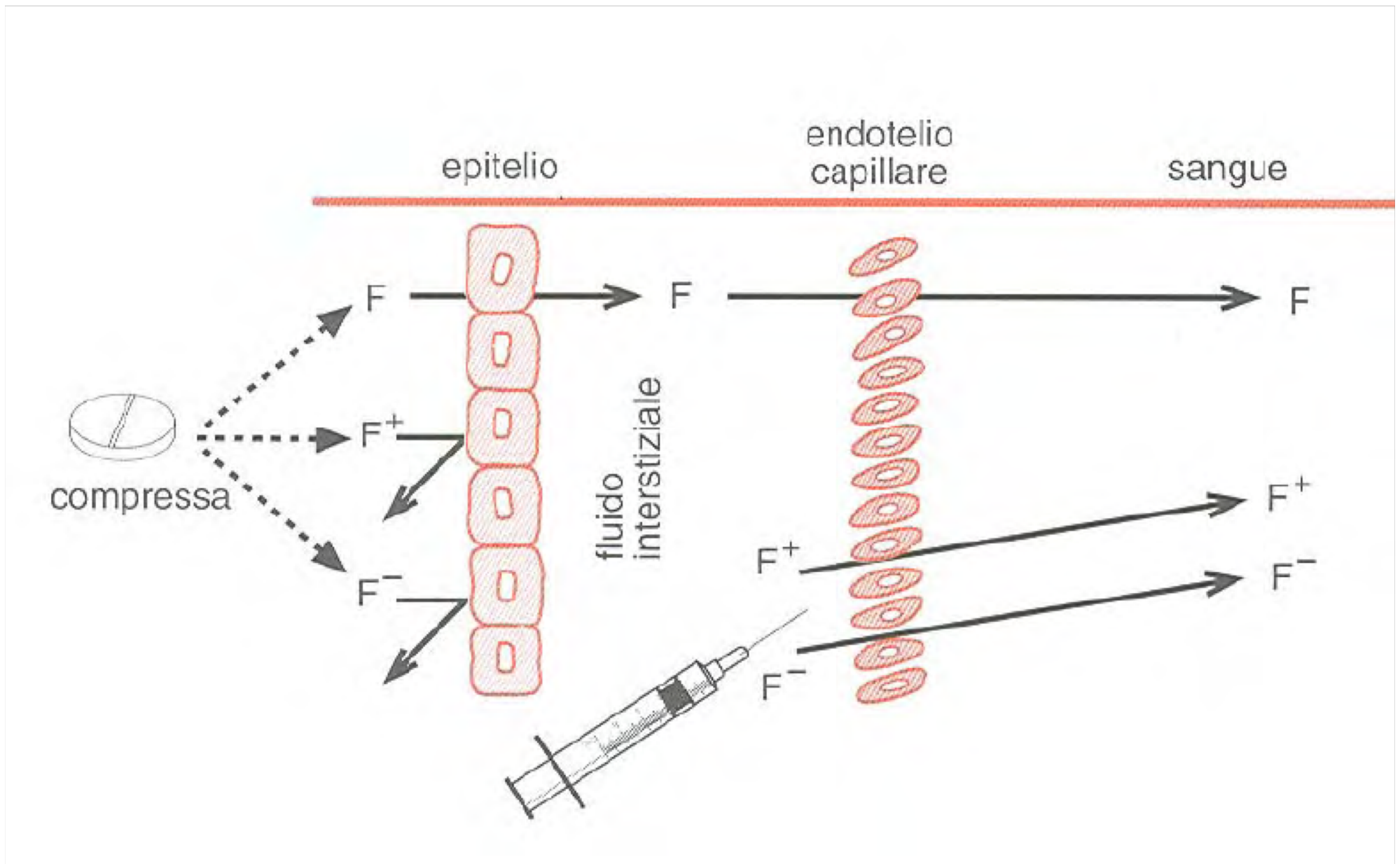


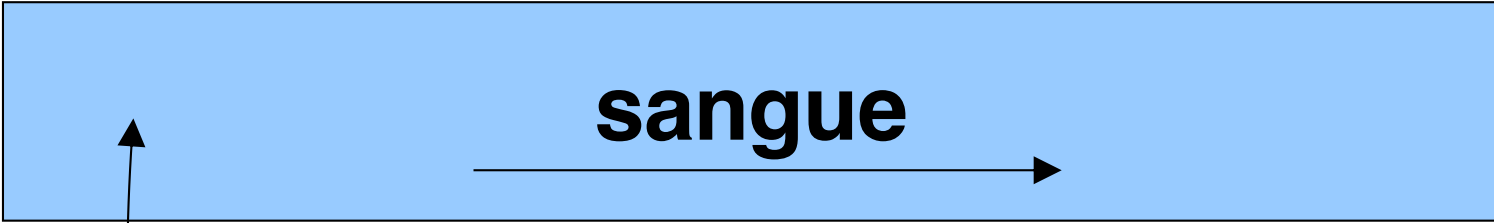


# Endocitosi

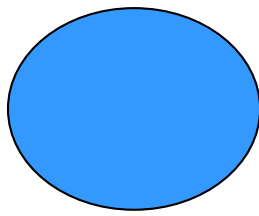
- Processo per cui porzioni di membrana cellulare, introflettendosi e chiudendosi su se stesse, si trasformano in vescicole intracellulari nelle quali rimangono intrappolati:
  1. Componenti della membrana stessa
  2. Sostanze dissolte nei fluidi extracellulari (fluid phase endocytosis)
  3. Sostanze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





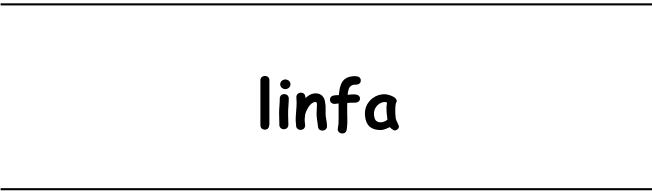


Farmaci a basso PM



Sito di iniezione

Farmaci ad alto PM





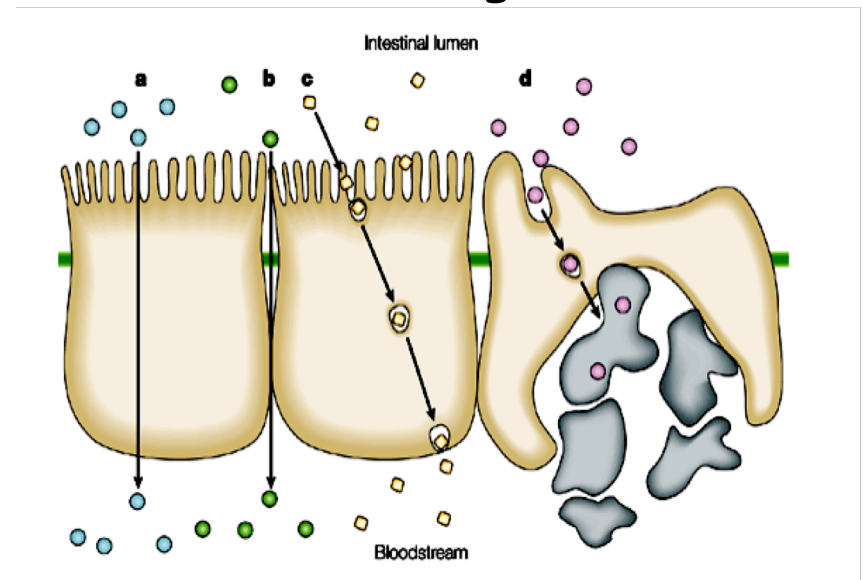
# Farmacocinetica dei farmaci proteici e peptidici: **assorbimento**

## 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,  $\beta$ -ciclodestrine metilate
  - con l'impiego di liposomi
- Prolungare il tempo di esposizione (per esempio, tecnologie di bioadesione)



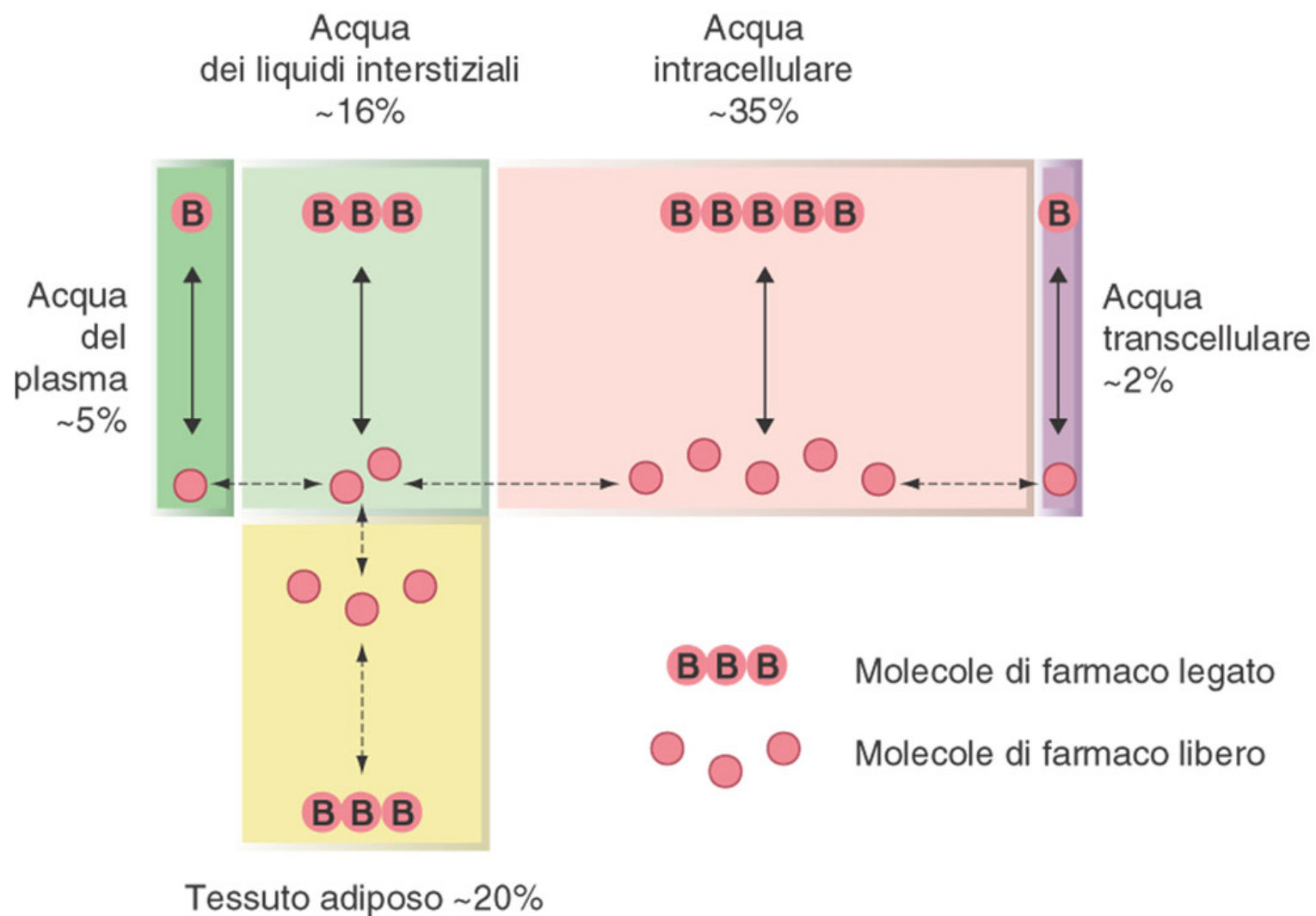
# Vie di somministrazione dei farmaci proteici

- 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

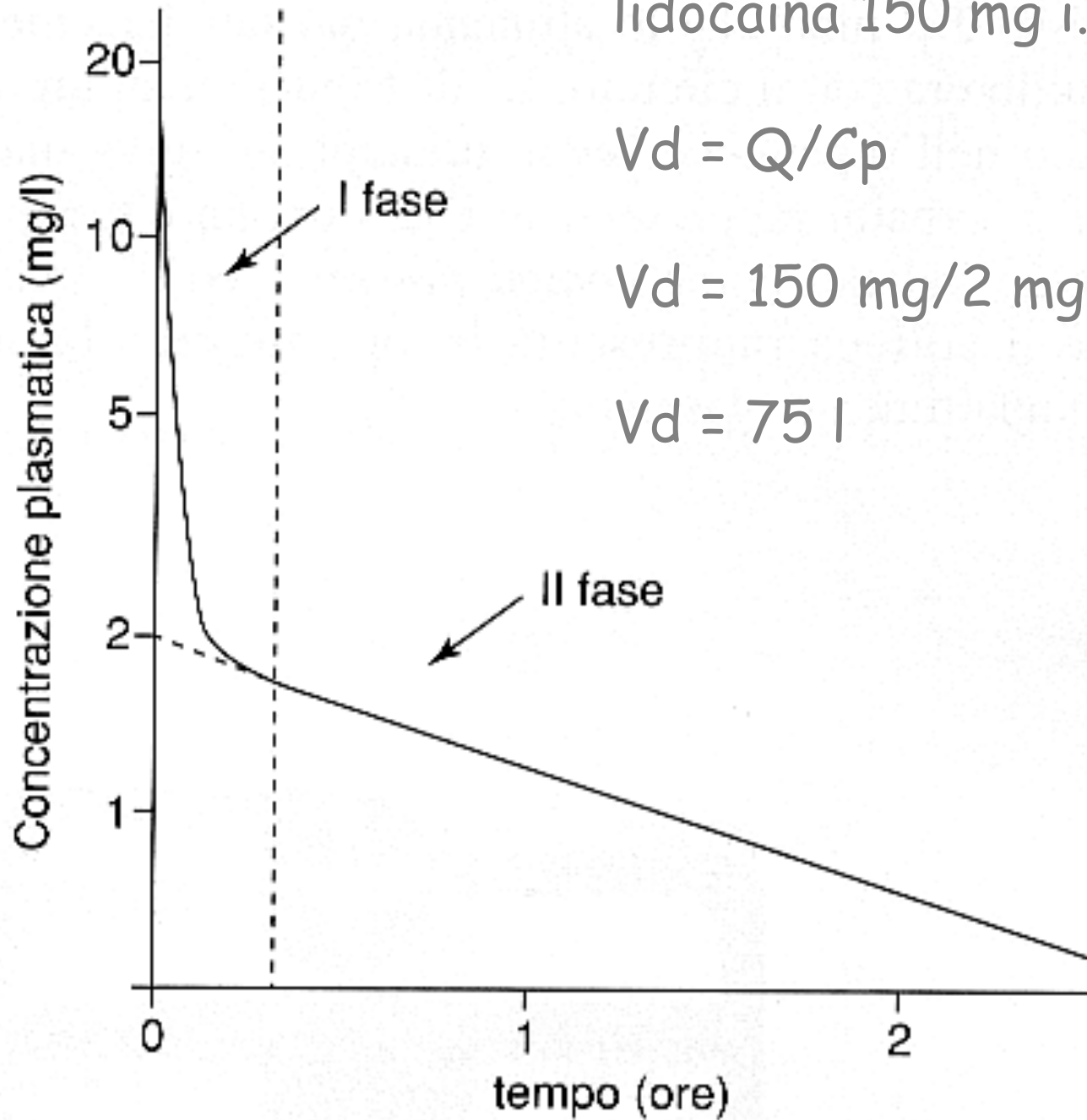
# DISTRIBUZIONE DEI FARMACI



# DISTRIBUZIONE DEI FARMACI

- Il volume di distribuzione ( $V_d$ ) viene definito come il volume di liquido che conterrebbe la quantità totale di farmaco nell'organismo se questo avesse in quel volume una concentrazione uguale a quella plasmatica

$$V_d = Q/C_p$$



lidocaina 150 mg i.v.

$$Vd = Q/Cp$$

$$Vd = 150 \text{ mg} / 2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$$

$$Vd = 75 \text{ l}$$

# Distribuzione dei farmaci proteici e peptidici

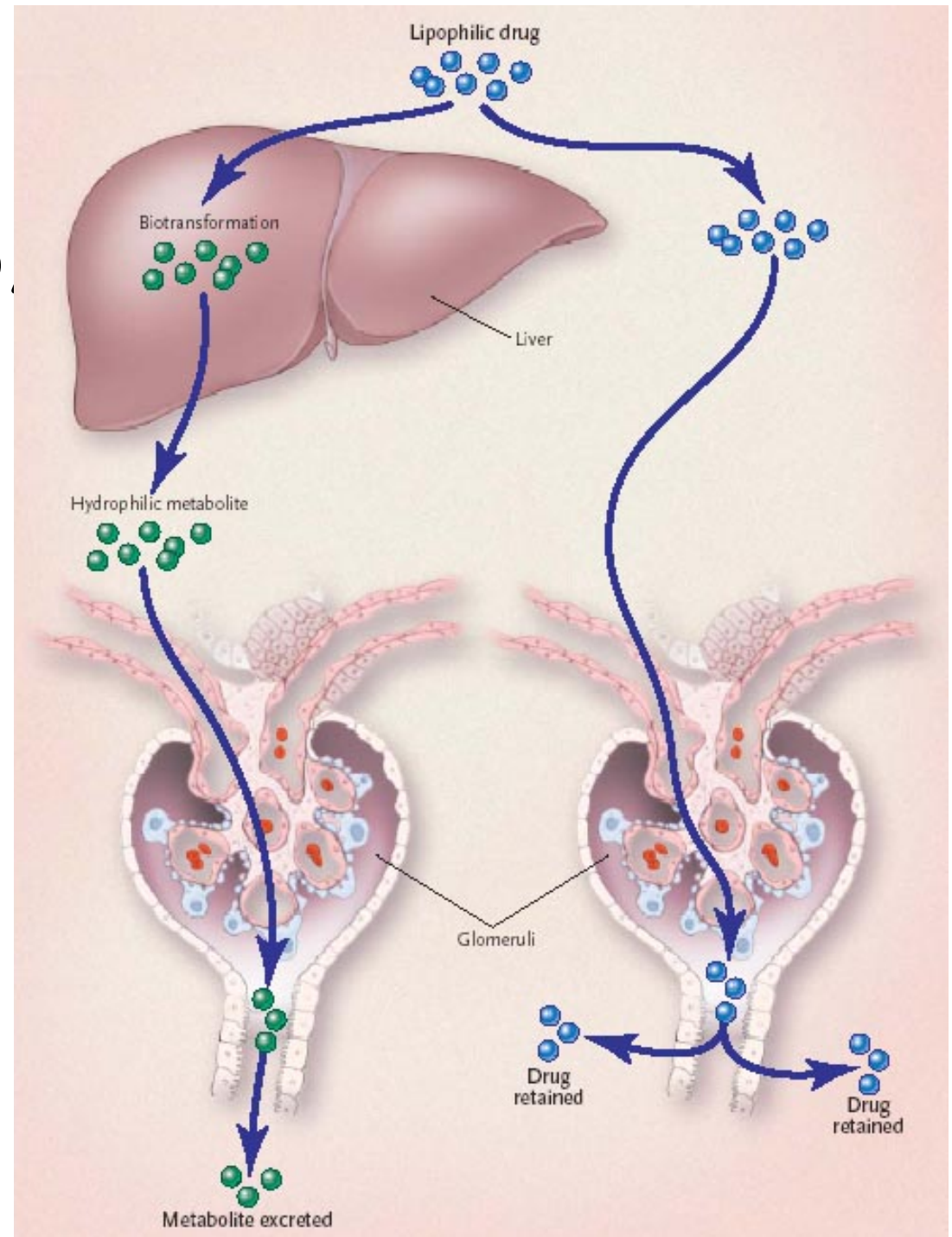
- Il volume di distribuzione apparente è di solito relativamente piccolo
- Per i farmaci somministrati per via endovenosa è di solito uguale o appena maggiore del volume totale del plasma

Proteina	Peso molecolare (kDa)	Vd (l)
Eritropoietina	30,4	2,8 - 3,5
Anticorpi monoclonali	150	5,6



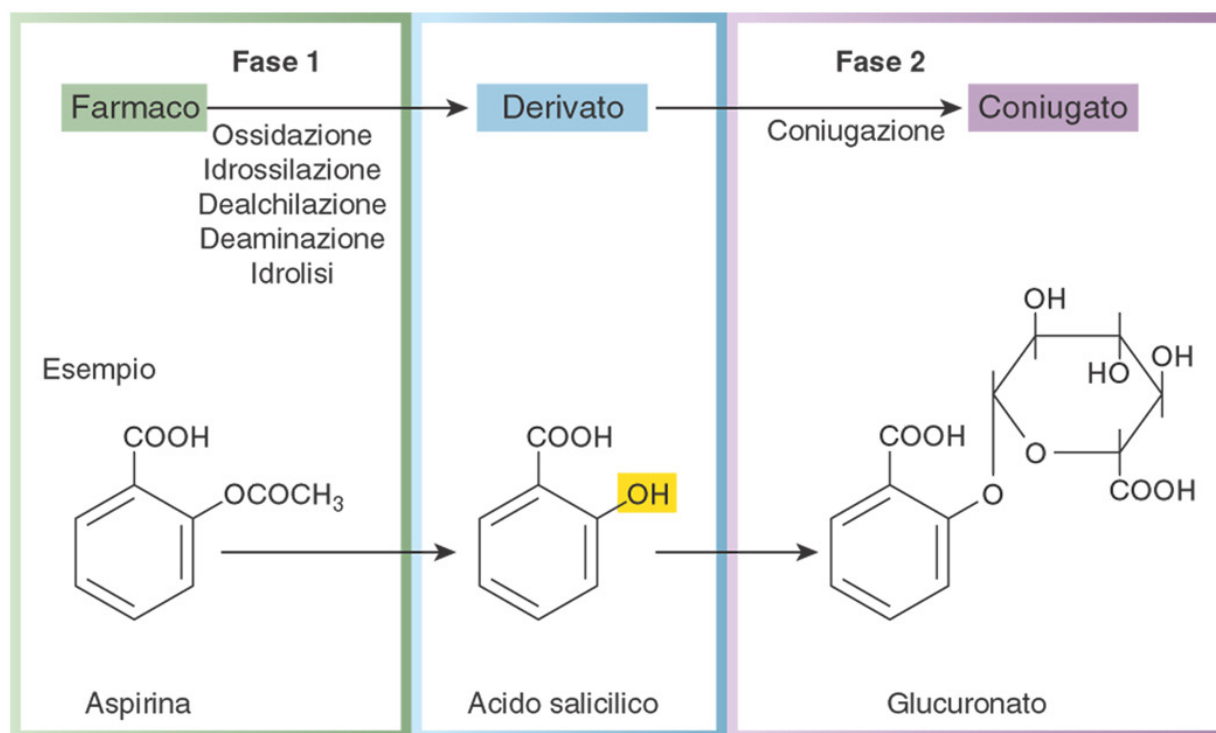
# Biotrasformazione

- Avviene soprattutto, ma non solo, nel fegato
- Rende i farmaci più polari, meno liposolubili e quindi più facilmente eliminabili dal rene

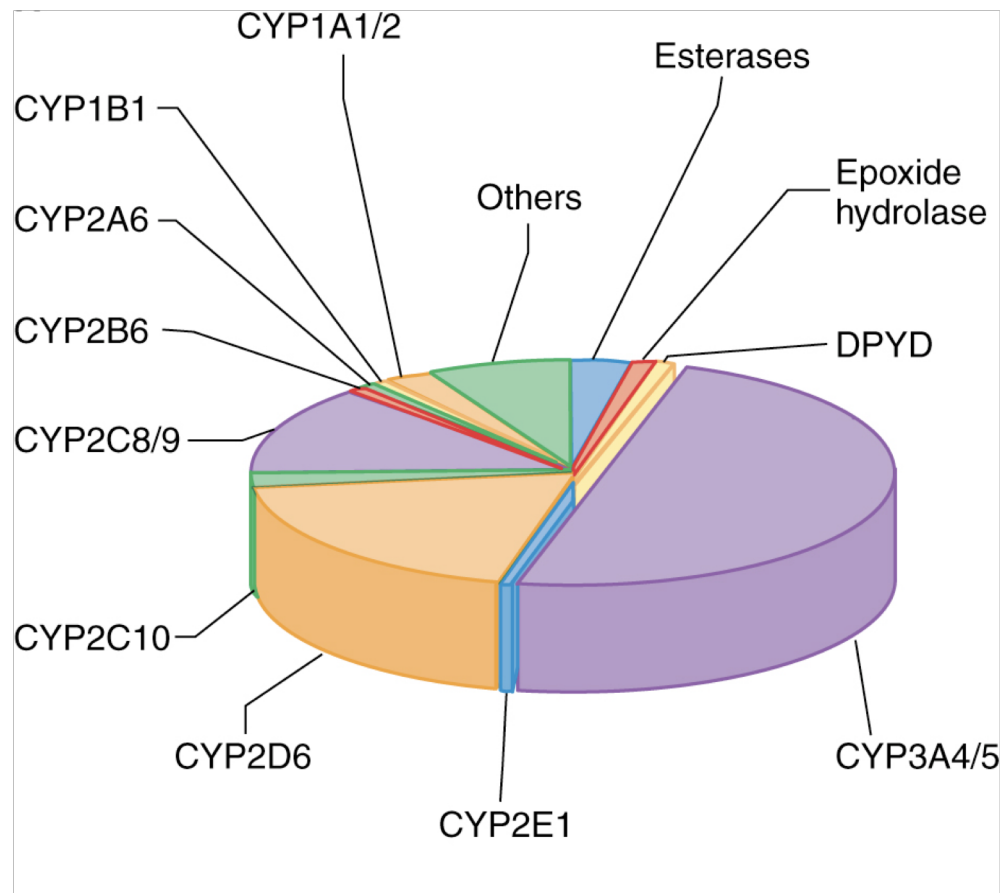


# Metabolismo dei farmaci

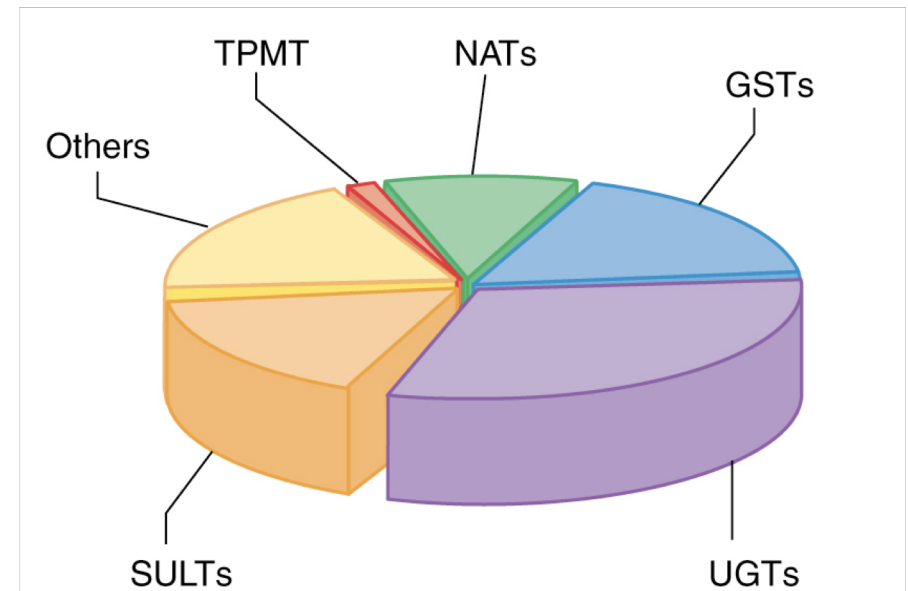
- **Reazioni di fase I o di funzionalizzazione:** hanno la finalità di inserire o mettere in evidenza gruppi funzionali di legame (-OH, -SH, -NH<sub>2</sub>, -COOH) per le reazioni di coniugazione. Dal punto di vista chimico sono prevalentemente reazioni di ossidazione, riduzione, idrolisi
- **Reazioni di fase II o di coniugazione:** glicuroconiugazione, solfatazione, metilazione, acetilazione, coniugazione con aminoacidi, con glutazione....



## Reazioni di fase 1



## Reazioni di fase 2



# Eliminazione

Molecular weight	Elimination site	Predominant elimination mechanisms	Major determinant
< 500	Blood, liver	Extracellular hydrolysis Passive lipid diffusion	Structure, lipophilicity
500–1,000	Liver	Carrier-mediated uptake Passive lipid diffusion	Structure, lipophilicity
1,000–50,000	Kidney	Glomerular filtration and subsequent degradation processes (see Fig. 4)	Molecular weight
50,000–200,000	Kidney, liver	Receptor-mediated endocytosis	Sugar, charge
200,000–400,000		Opsonization	$\alpha_2$ -macroglobulin, IgG
> 400,000		Phagocytosis	Particle aggregation

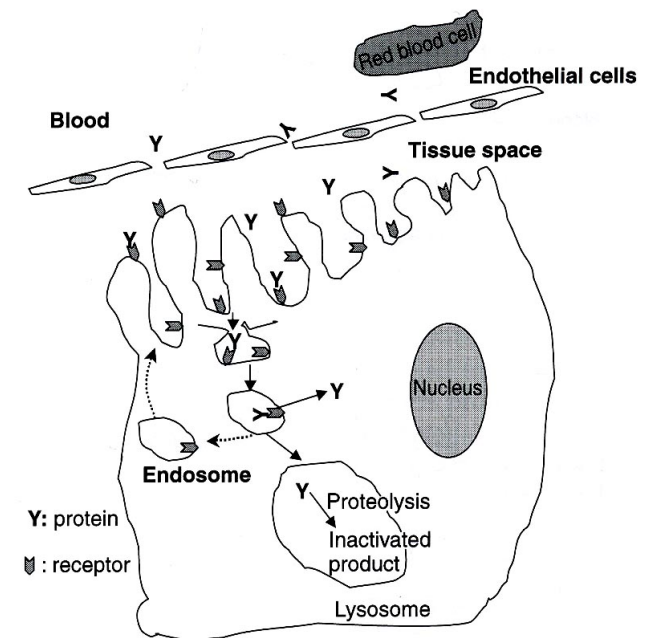
*Note:* Other determining factors are size, charge, lipophilicity, functional groups, sugar recognition, vulnerability for proteases, aggregation to particles, formation of complexes with opsonization factors, etc. Mechanisms may overlap and endocytosis may occur at any molecular weight range.

*Source:* After Meijer and Ziegler, 1993.

**Table 1** ■ Molecular weight as major determinant of the elimination mechanisms of peptides and proteins.

# Metabolismo epatico dei farmaci proteici e peptidici

- Entrano negli epatociti per endocitosi mediata da recettore (insulina, epidermal growth factor, glicoproteine)
- Vengono metabolizzate all'interno degli epatociti nei lisosomi (endopeptidasi poi esopeptidasi)



# Eliminazione recettore mediata ad opera di altre cellule

- Per alcune molecole proteiche (> 200 kDa) è importante la fagocitosi mediata da recettore da parte di cellule specializzate, seguita dal catabolismo intracellulare
  - M-CSF (fattore di stimolazione delle colonie di macrofagi) e G-CSF (fattore di stimolazione delle colonie di granulociti) vengono captati dal midollo osseo tramite un processo recettore mediato e soggetto a saturazione

# OPSONIZATION

## COMPLEMENT-MEDIATED PHAGOCYTOSIS

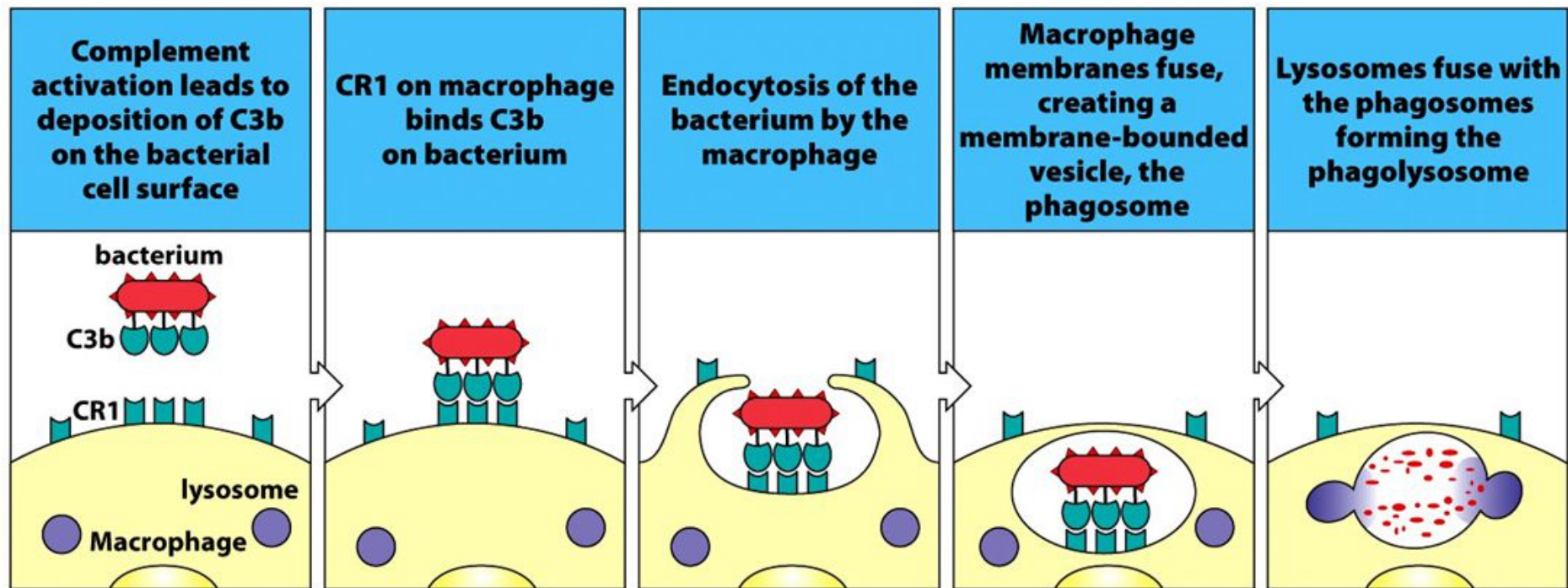
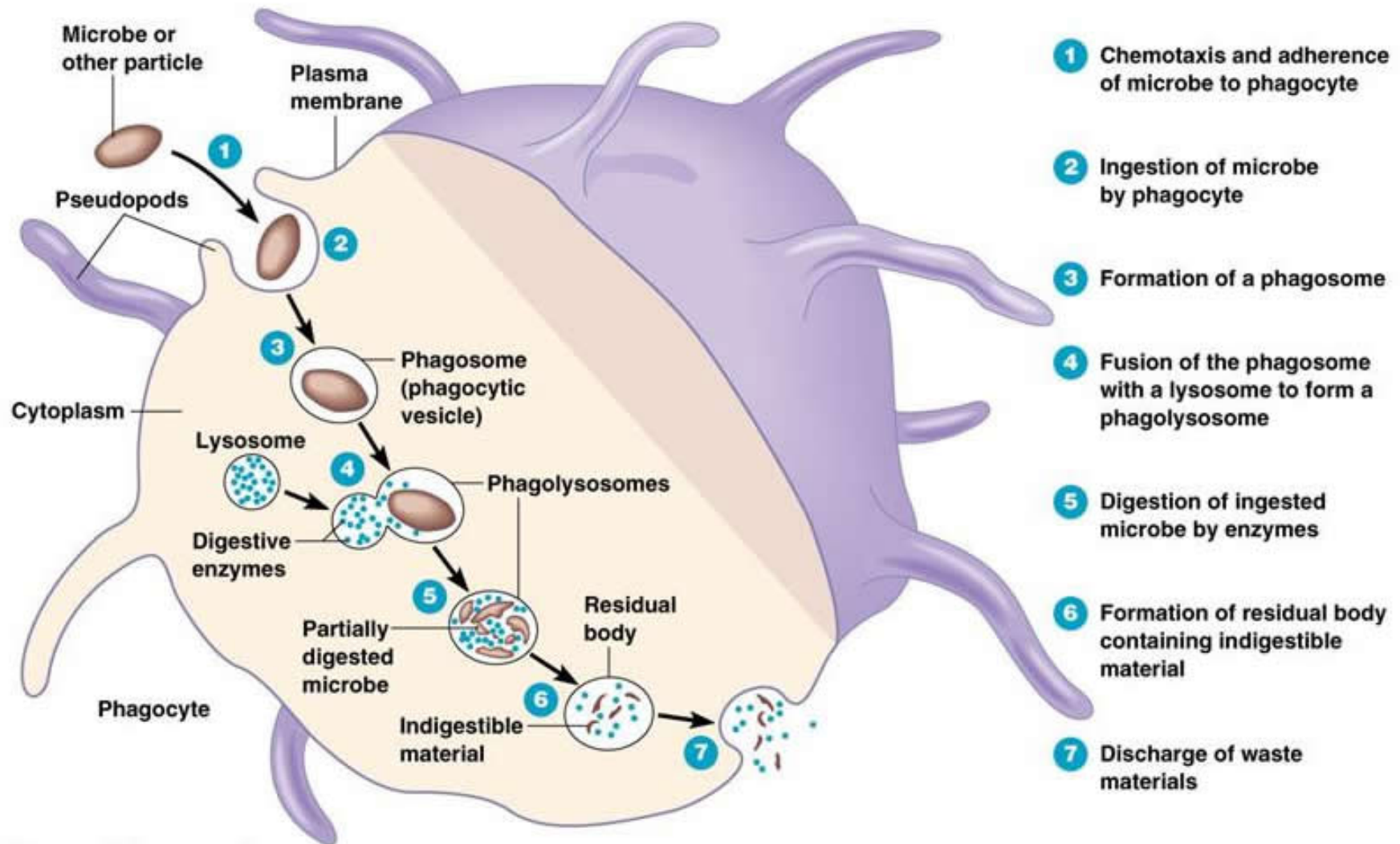


Figure 2.10 The Immune System, 3ed. (© Garland Science 2009)

# Fagocitosi



Phases of phagocytosis