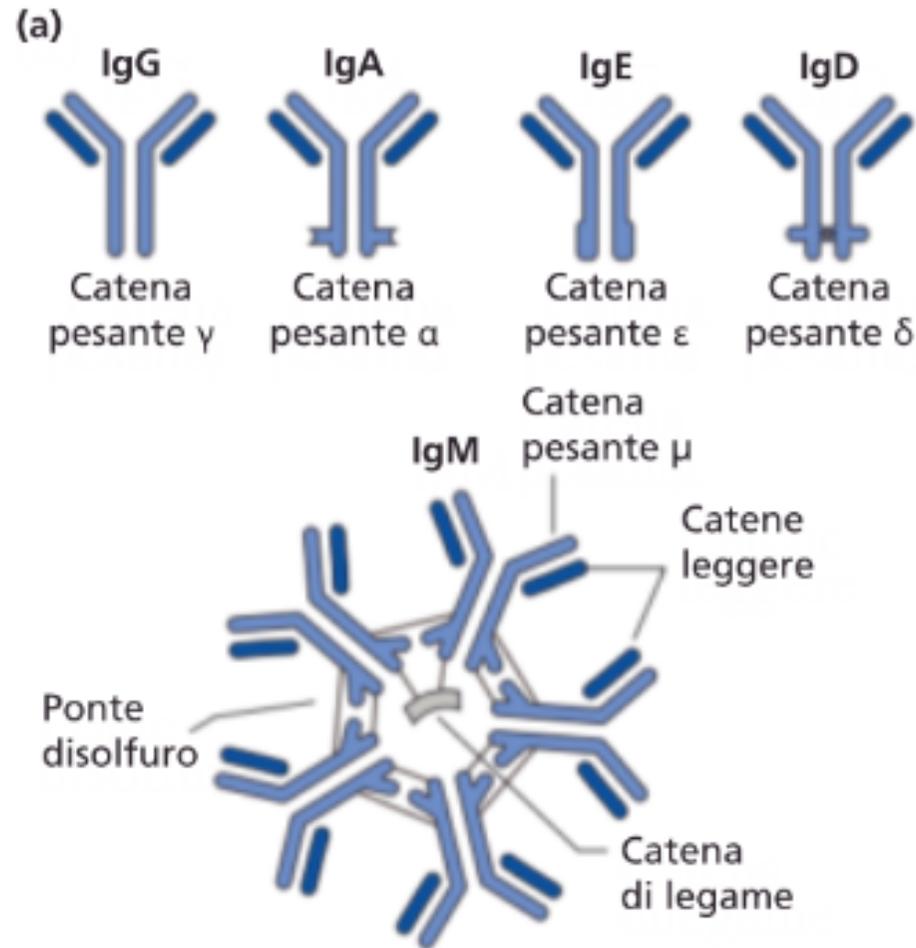
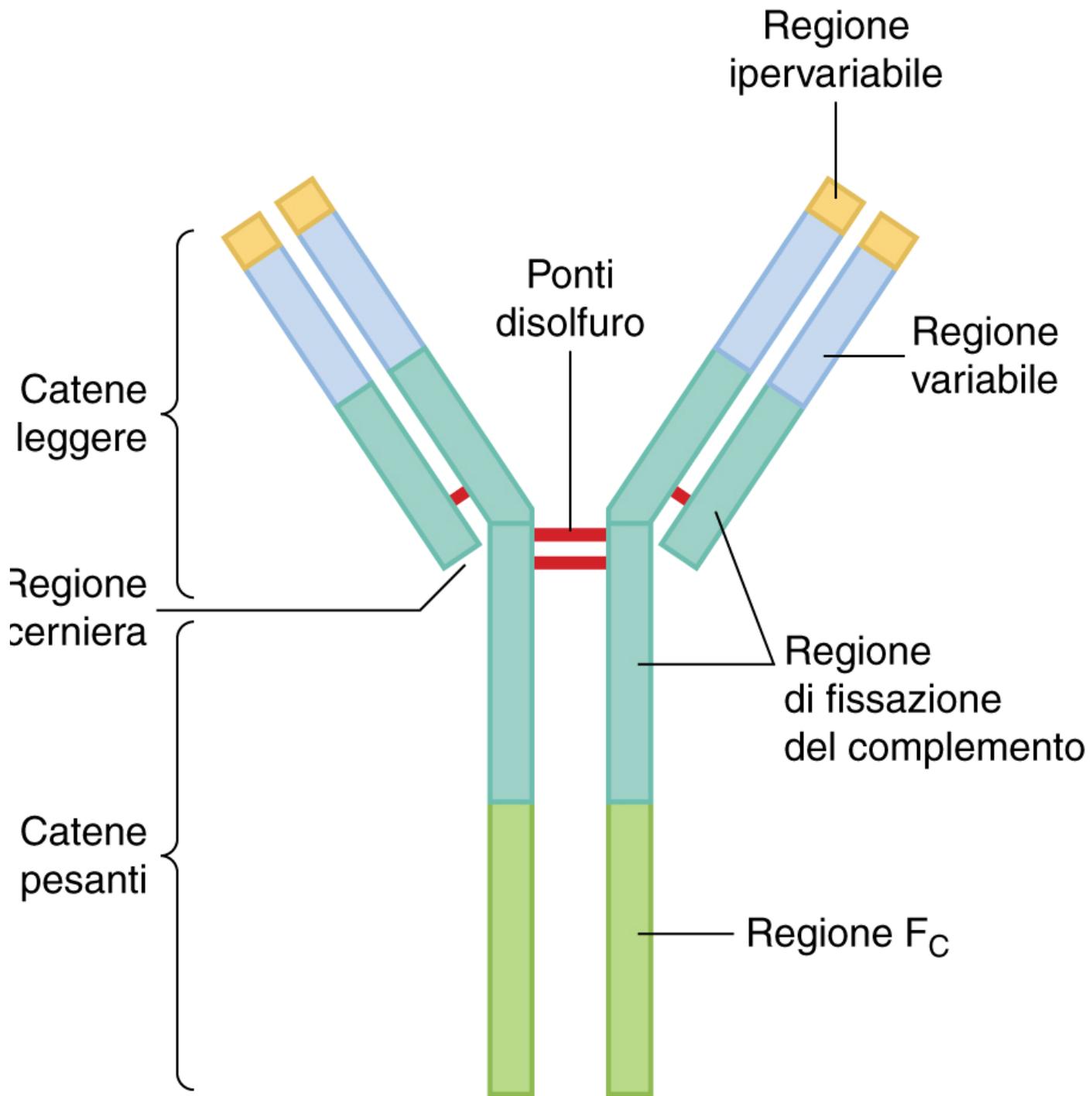


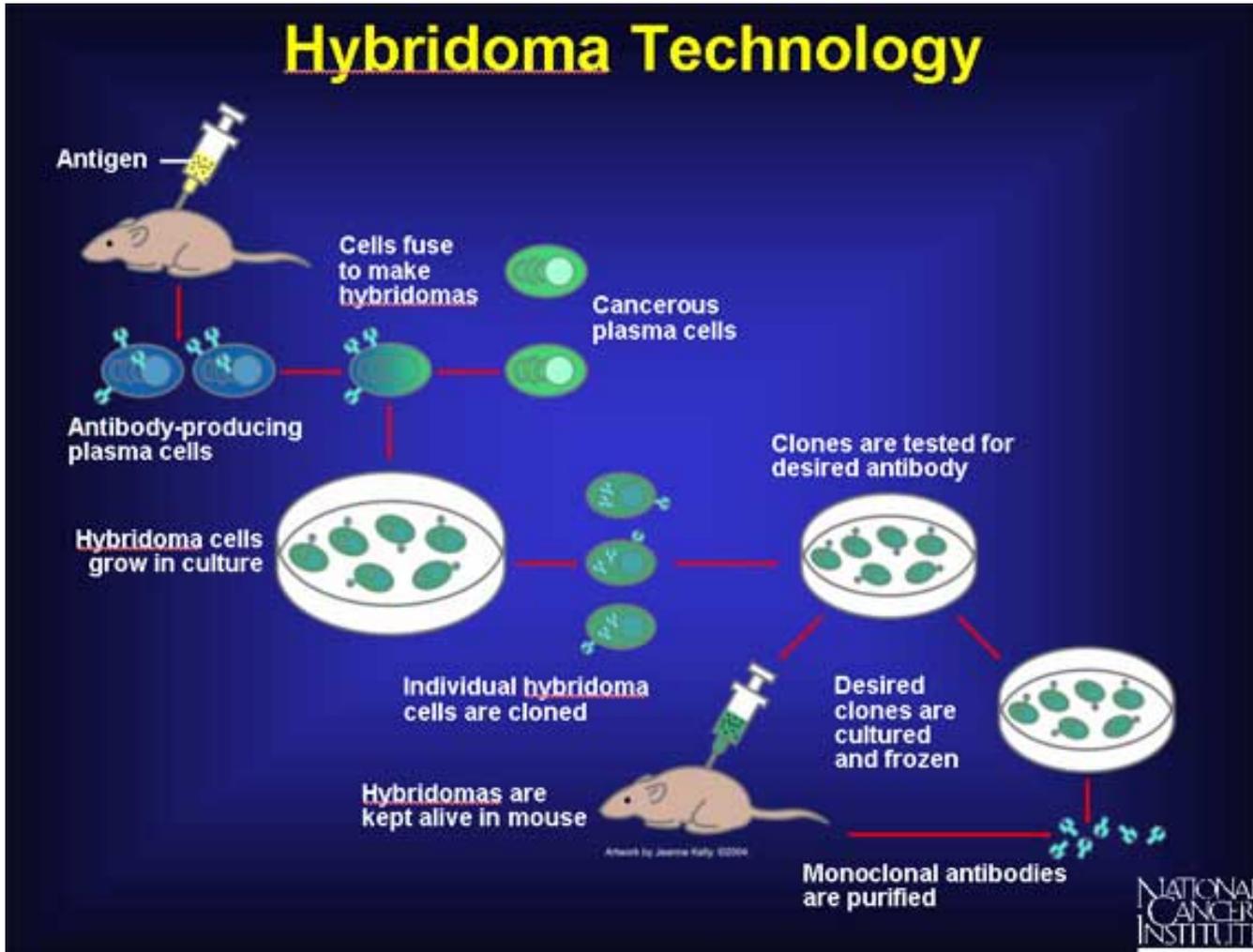
Anticorpi monoclonali



Glicoproteine prodotte e secrete nel sangue da linfociti B dei vertebrati in seguito alla maturazione in plasmacellule indotta dall'esposizione a un antigene.



Hybridoma Technology



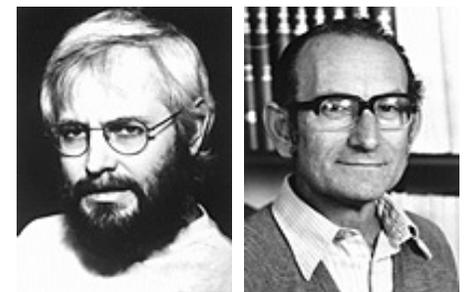
1984 – premio Nobel per la medicina

Kohler & Milstein

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

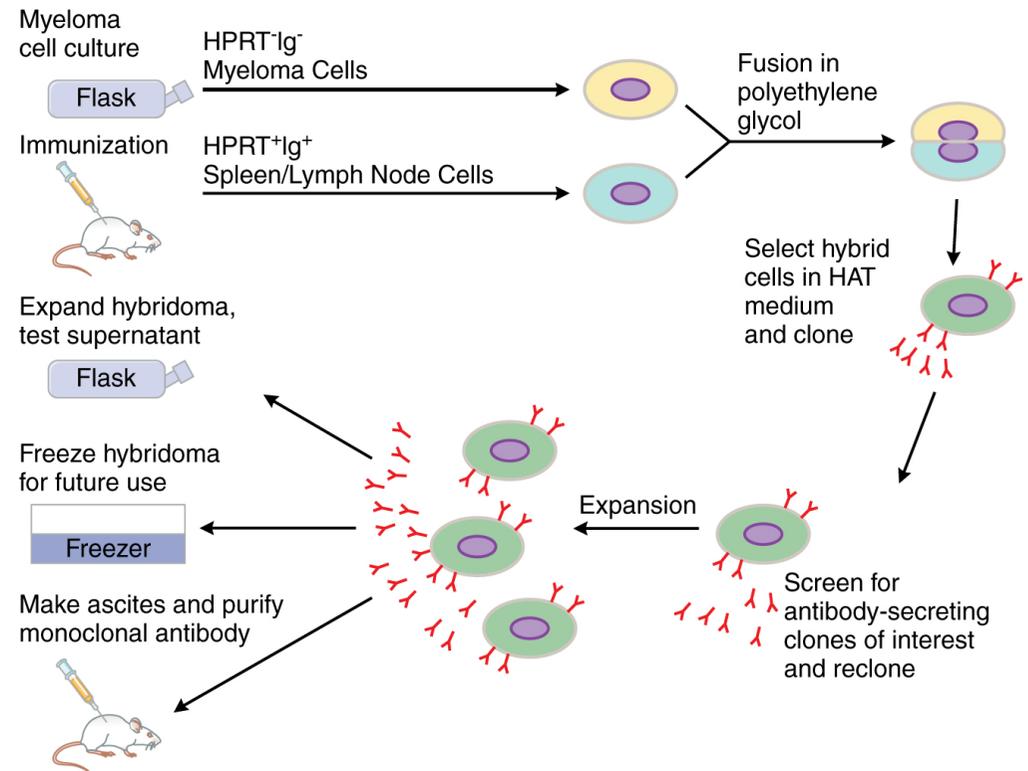
Nature. 1975 Aug 7;256(5517):495-7

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 (non possiedono TK e HGPRT). 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).

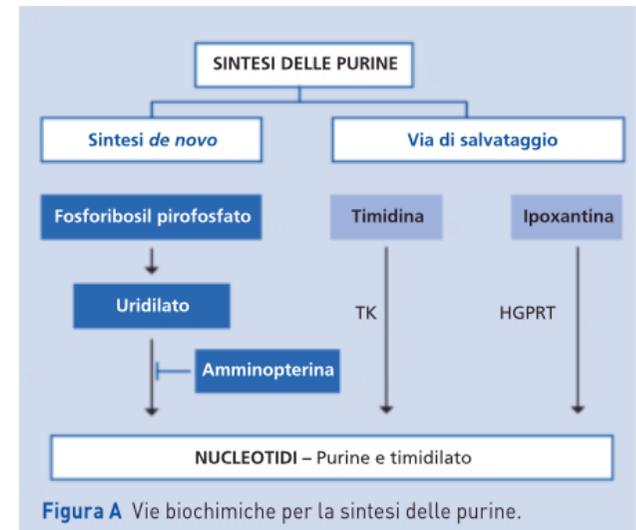


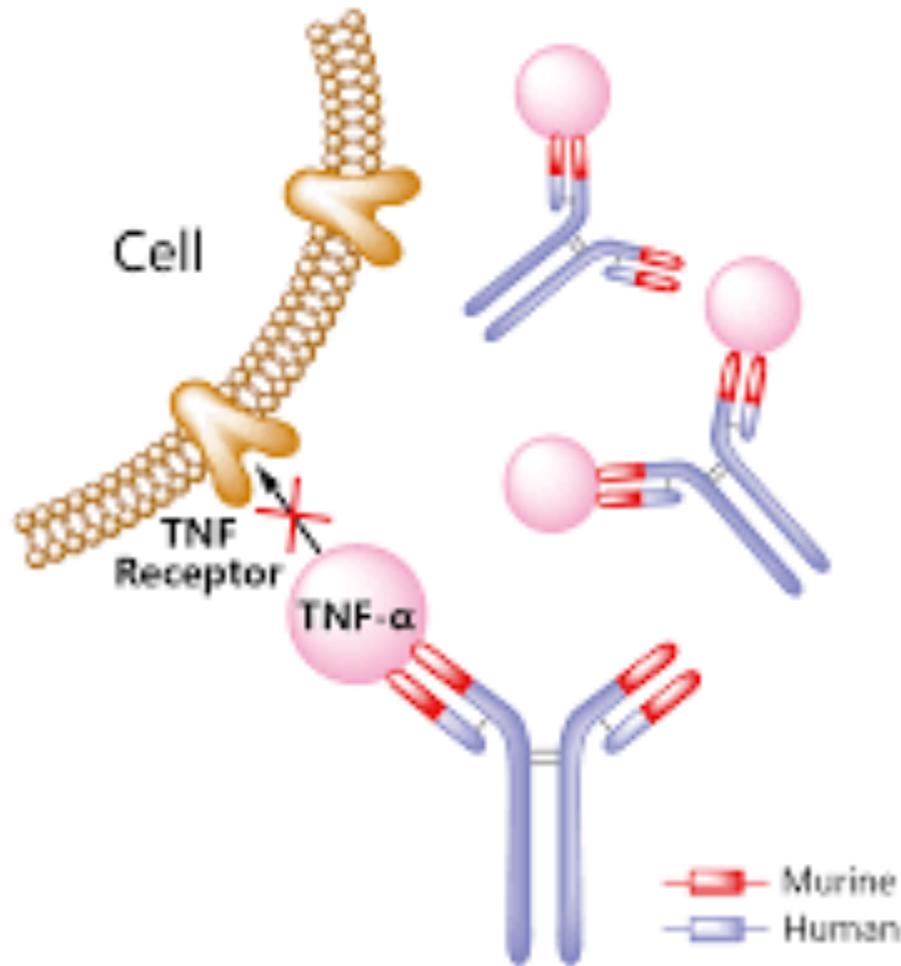
Figura A Vie biochimiche per la sintesi delle purine.

TK: timidina kinasi
HGPRT: ipoxantina guanosina
fosforibosil-trasferasi

Anticorpi terapeutici ottenuti con la tecnologia dell'ibridoma

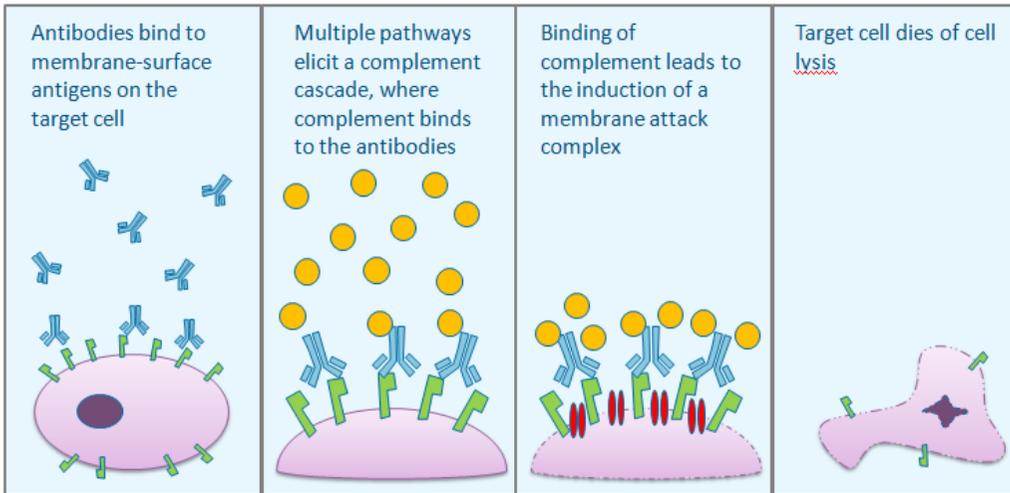
- Ha reso possibile l'ottenimento di grandi quantità di anticorpi specifici per un determinato antigene.
- Storicamente, il primo anticorpo monoclonale il cui uso è stato autorizzato nei pazienti è un anti-CD3 dei linfociti T, **MUROMONAB** o **ortoclone OKT3**, per trattare il rigetto acuto dopo trapianto 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

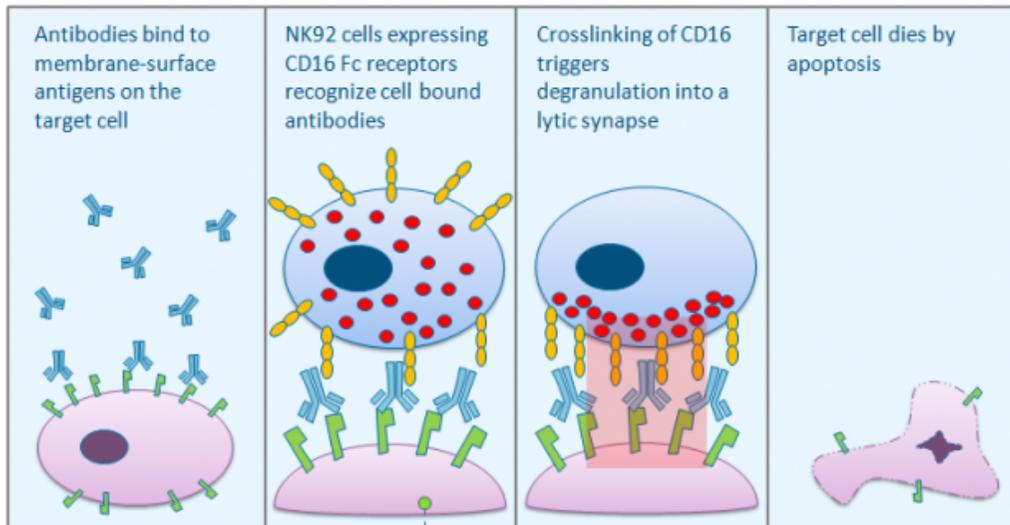


Modulazione diretta
dell'antigene bersaglio =
terapie anti-TNF α o anti-IgE

Meccanismi con cui gli anticorpi inducono gli effetti terapeutici



Azione citotossica mediata dal complemento (CDCC)



Azione citotossica mediata da cellule (ADCC)

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
		{ TRASTUZUMAB	{ CANCRO SENO 0.1
<i>Human anti-human antibodies</i>	{ 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.

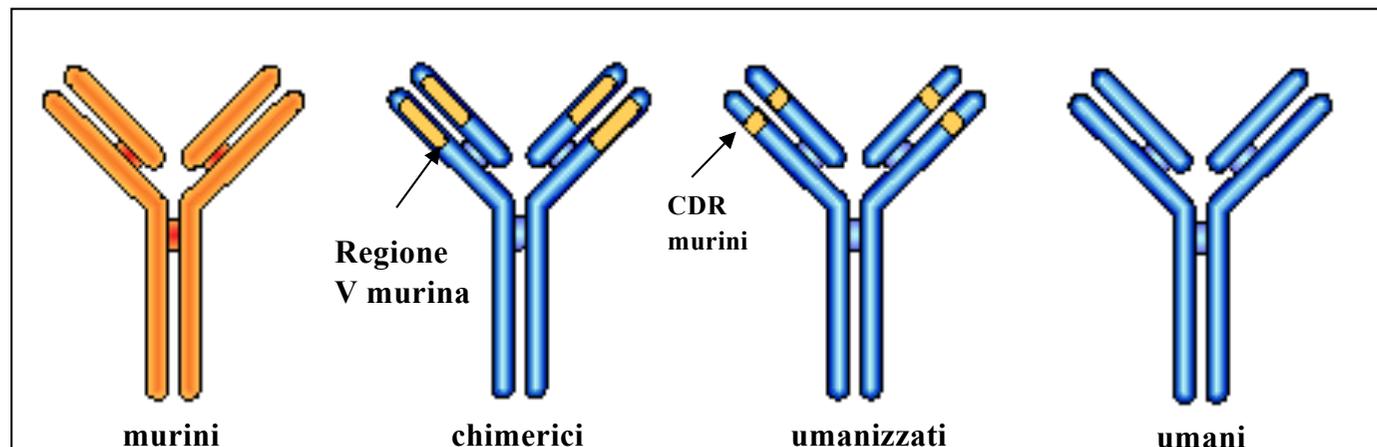
(da "Pharmaceutical Biotechnology" - 2008)

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.

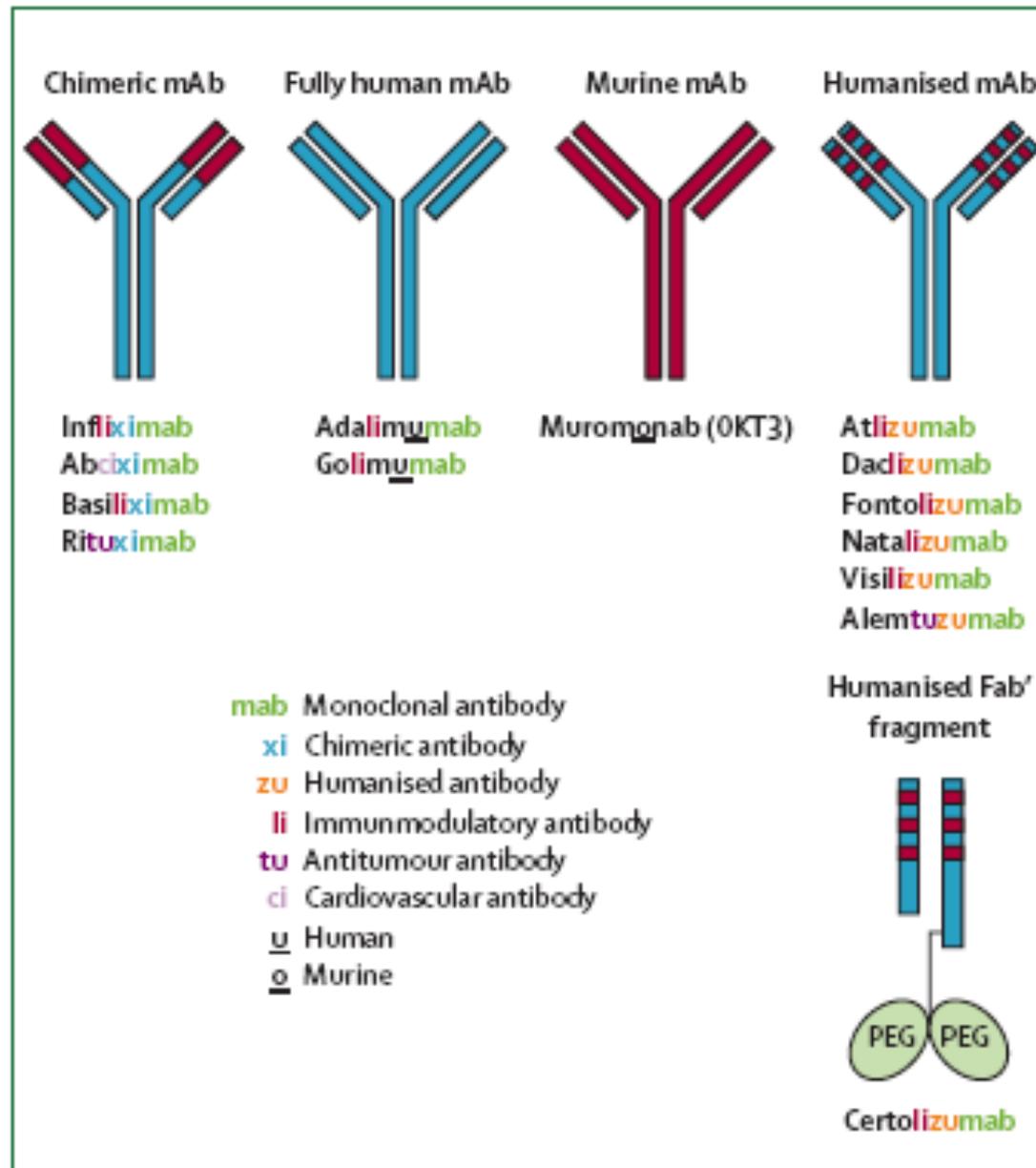
Negli ultimi 30 anni diversi approcci sono stati ideati in modo da "umanizzare" gli anticorpi murini.

- 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



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

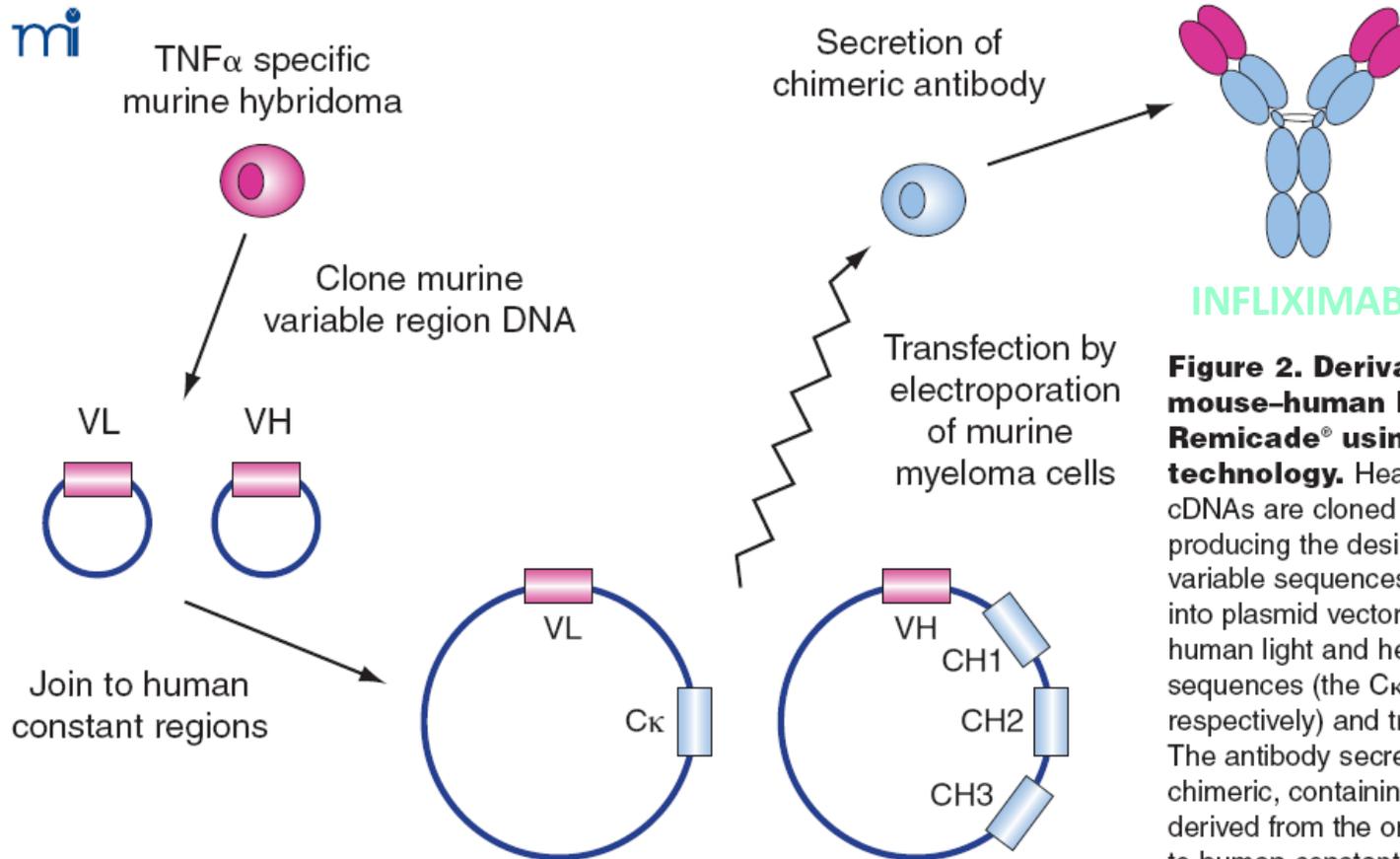


Figure 2. Derivation of chimeric mouse-human MABs such as Remicade[®] using recombinant DNA technology. Heavy and light chain variable cDNAs are cloned from a hybridoma cell clone producing the desired mouse MAb. These variable sequences (VL and VH) are inserted into plasmid vectors containing the desired 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

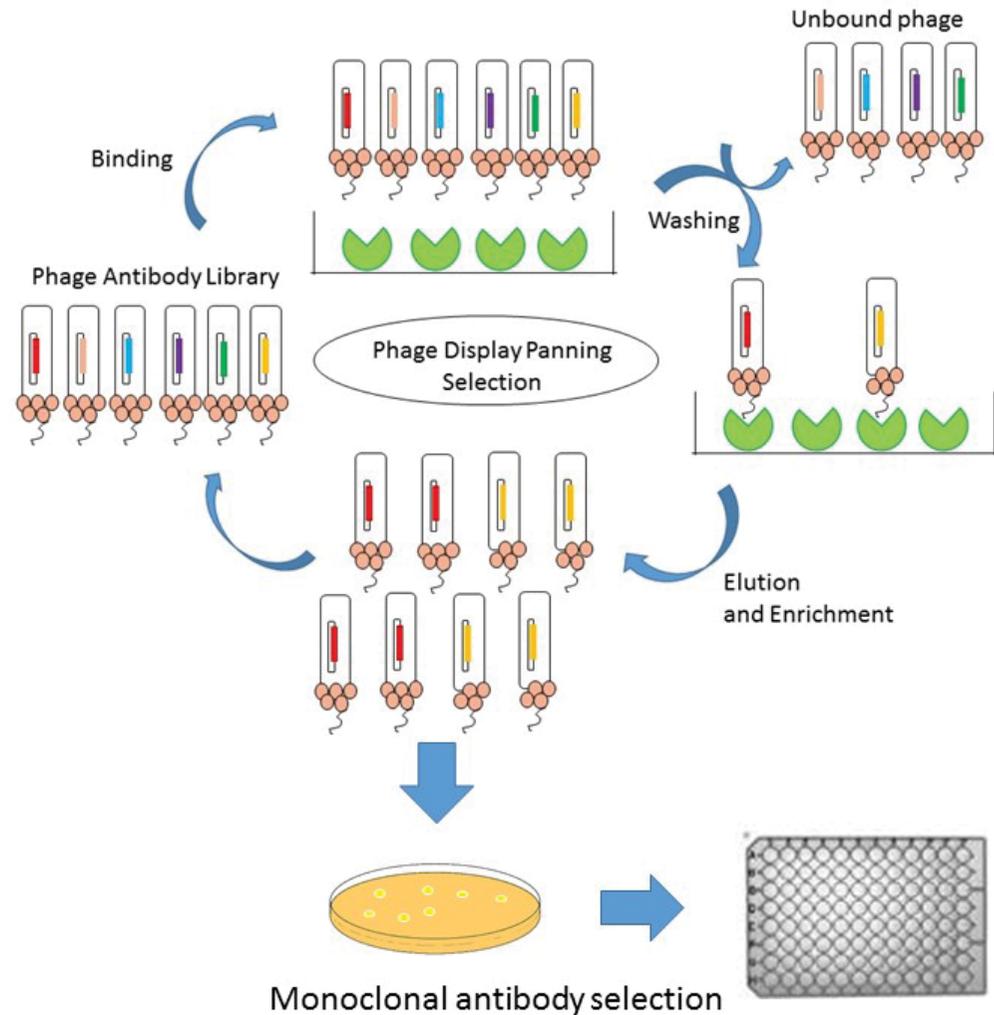
Possono essere prodotti impiegando due approcci:

- 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".



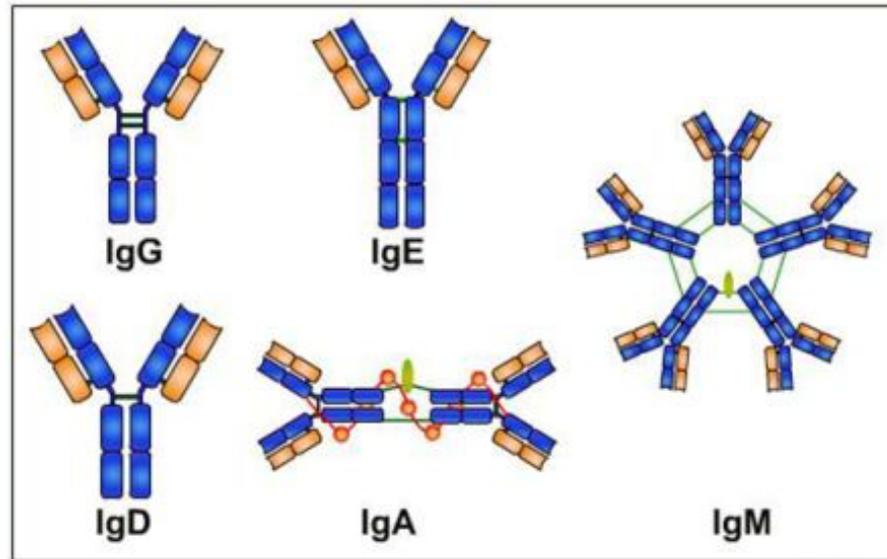
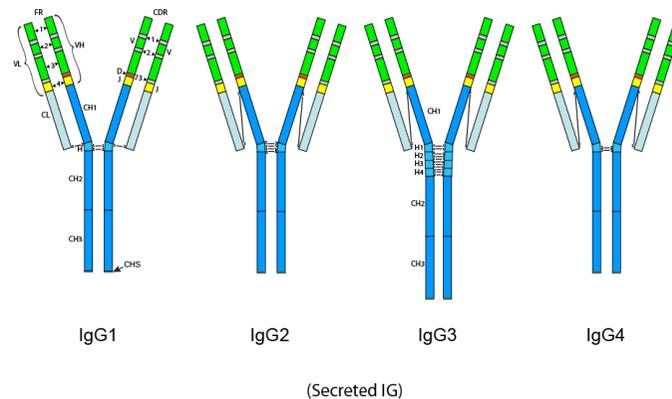


Tabella 10.1 Caratteristiche delle diverse classi di anticorpi.

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA	IgM	IgE	IgD
Catena H	$\gamma 1$	$\gamma 2$	$\gamma 3$	$\gamma 4$	α	μ	ϵ	δ
Concentrazione plasmatica (mg/mL)	9	3	1	0,5	2,1	1,5	$5 \cdot 10^{-5}$	0,03
Emivita plasmatica (giorni)	23	23	8	23	6	5	2,5	3
Trasporto attraverso l'epitelio	-	-	-	-	+++	+	-	-
Trasporto attraverso la placenta	+++	+	++	+	-	-	-	-
Diffusione nei siti extravascolari	+++	+++	+++	+++	++	-	-	+
Trasporto nelle mucose	-	-	-	-	++	+	-	-
Legame al recettore Fc su fagociti	++	+	++	+	-	?	-	-
Attivazione del complemento	+	+/-	++	-	-	++	-	-
Neutralizzazione	++	++	++	++	++	+	-	-
Opsonizzazione	+++	-	++	+	+	-	-	-

Human IgG class and subclasses



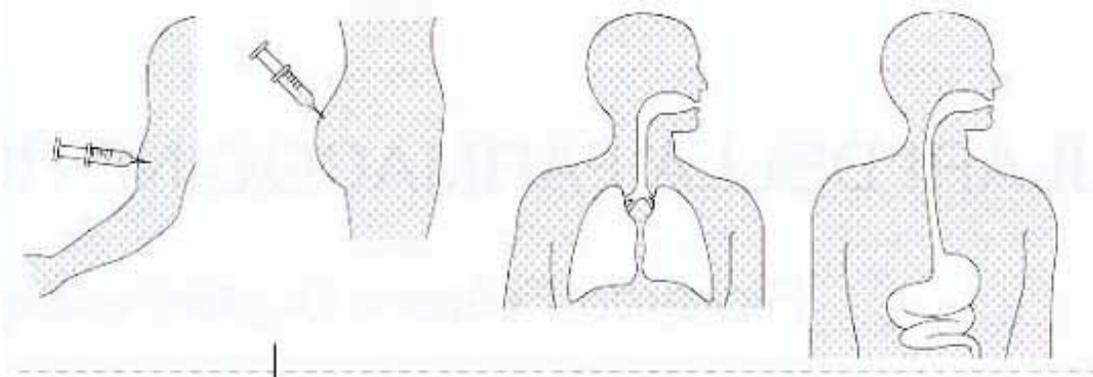
IgG subclass	Percentage in serum	Half life (days)	Binding affinity for FcγRIIa	Complement activation
IgG1	66	~21	+++	++
IgG2	23	~21	+/-	+
IgG3	7	~7	+++	+++
IgG4	4	~21	+ to -	-

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

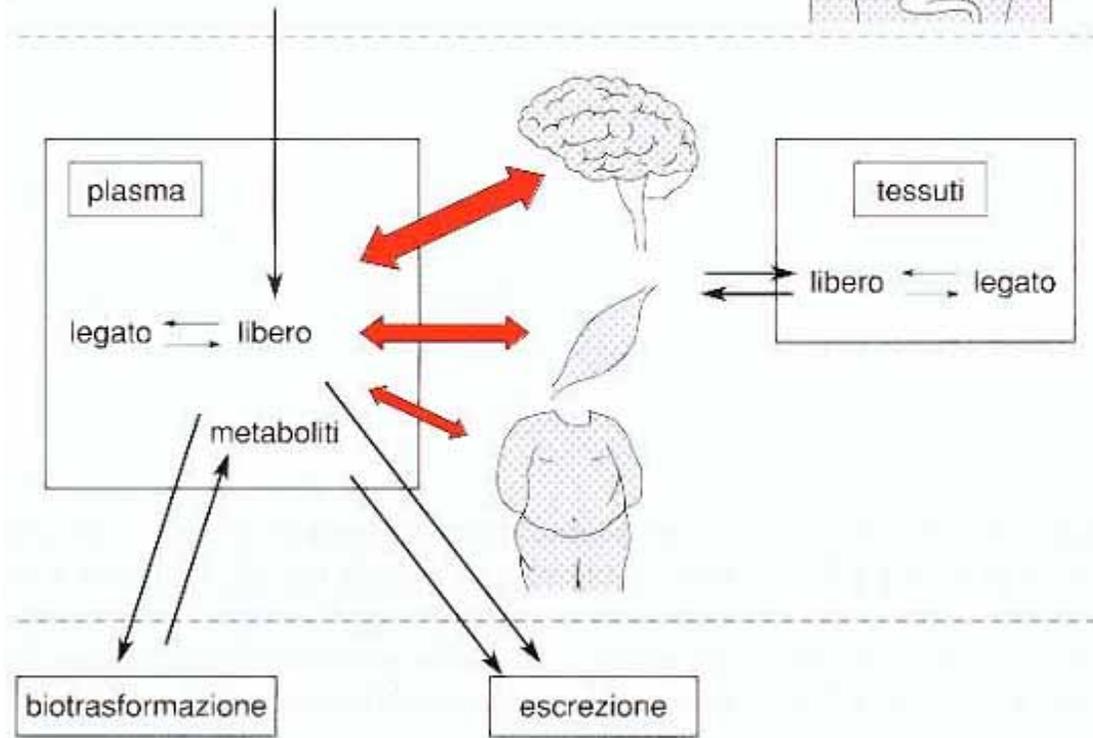
IgG2 e IgG4, non mediano la citotossicità, vengono scelti quando si vuole evitare la morte cellulare.

Farmacocinetica

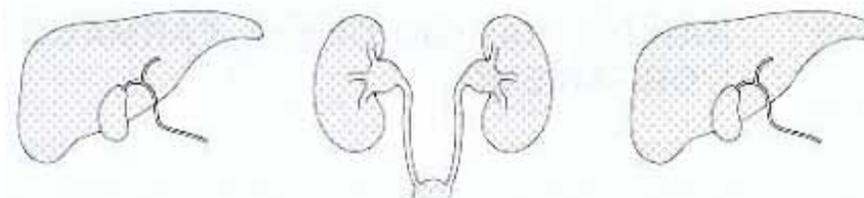
assorbimento



distribuzione



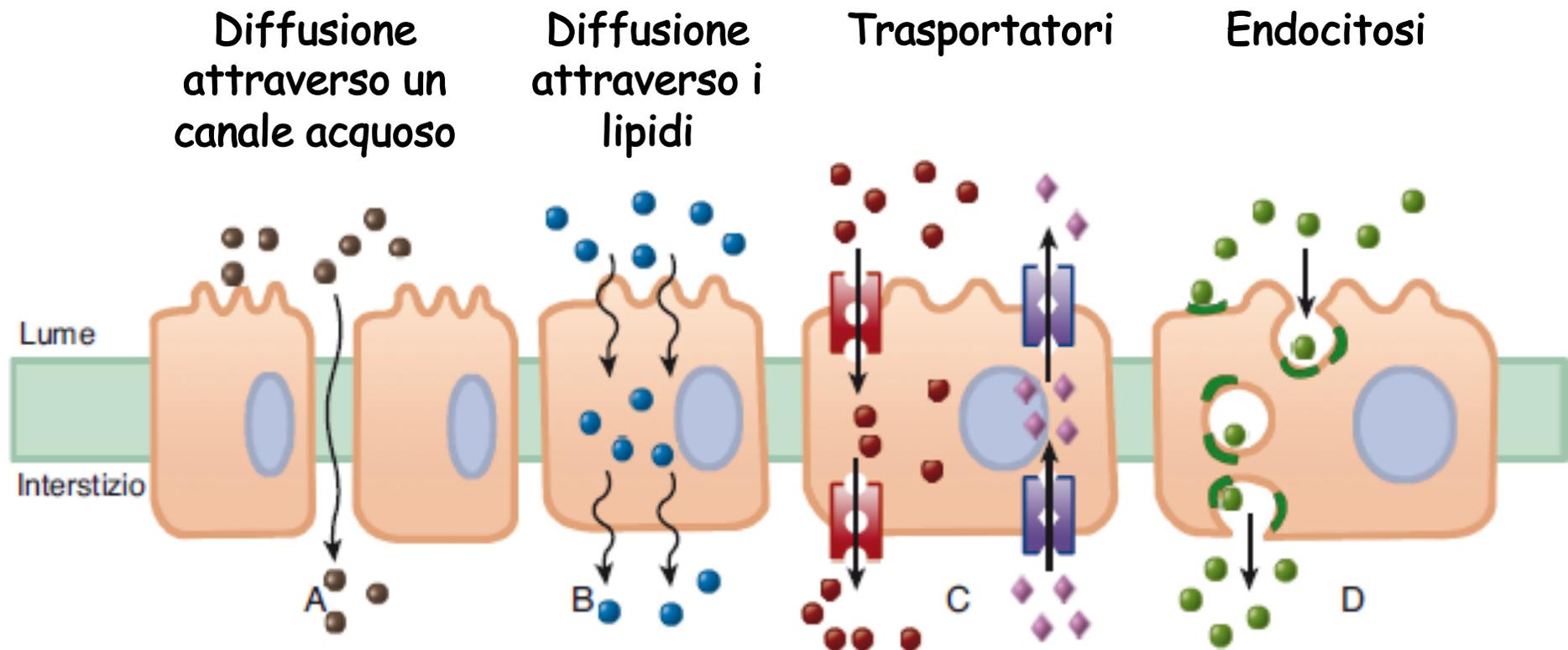
eliminazione



La complessità delle proteine

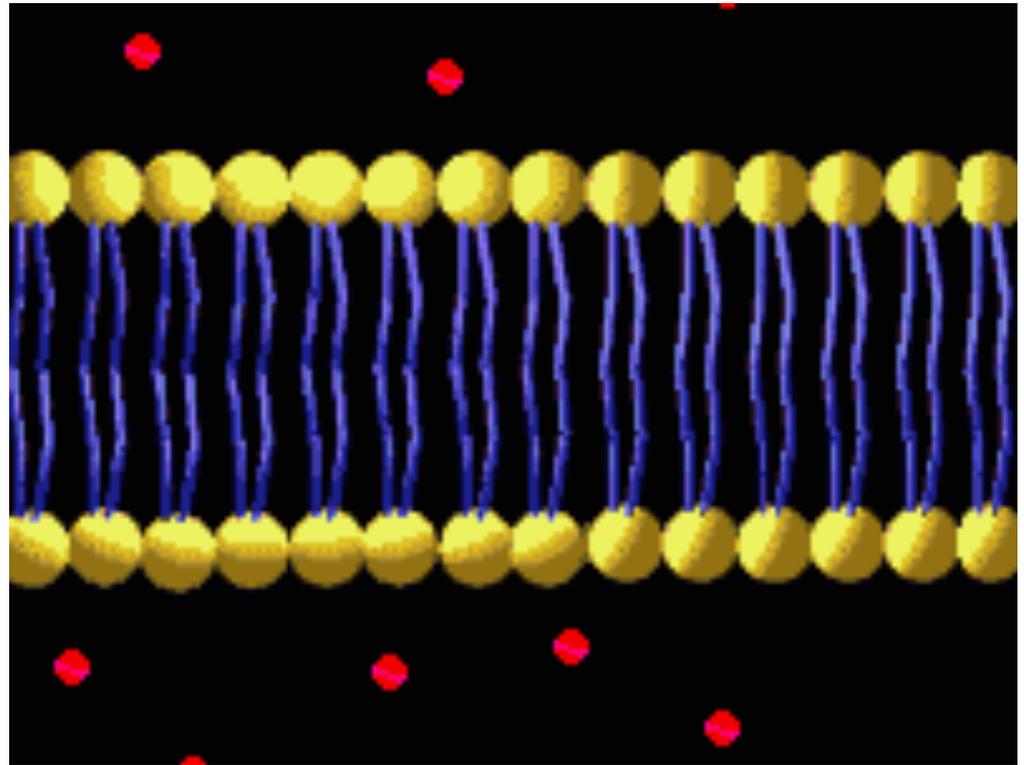
- Strutture molto **grandi e instabili**
- Struttura che si mantiene conformata con **forze di legame molto deboli**
- **Facile denaturazione** anche in condizioni non aggressive
- **Facilmente eliminate e distrutte dall'organismo**

Passaggio dei farmaci attraverso le membrane cellulari



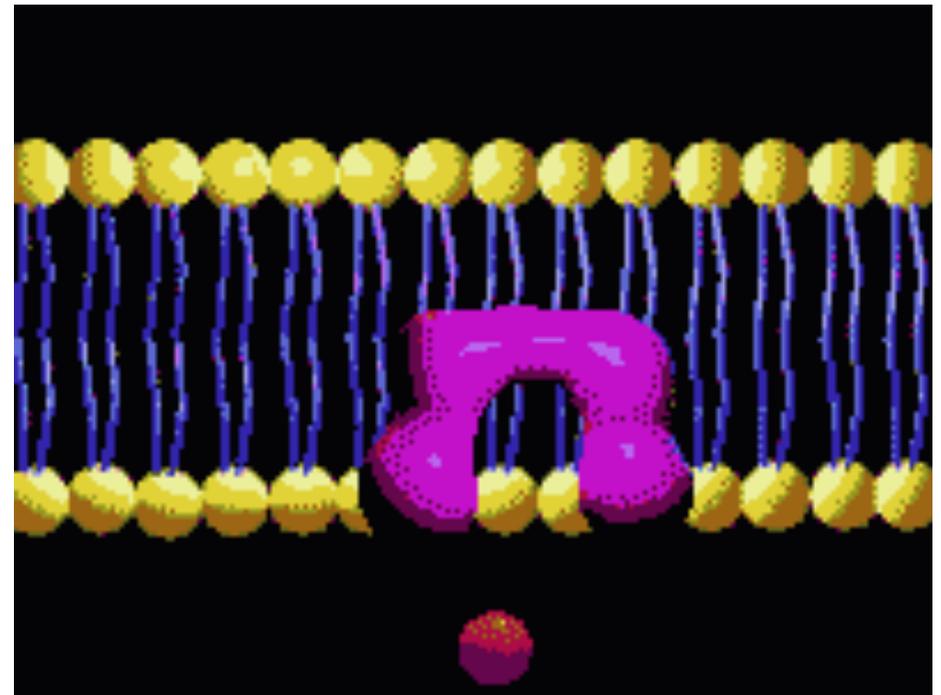
Diffusione semplice

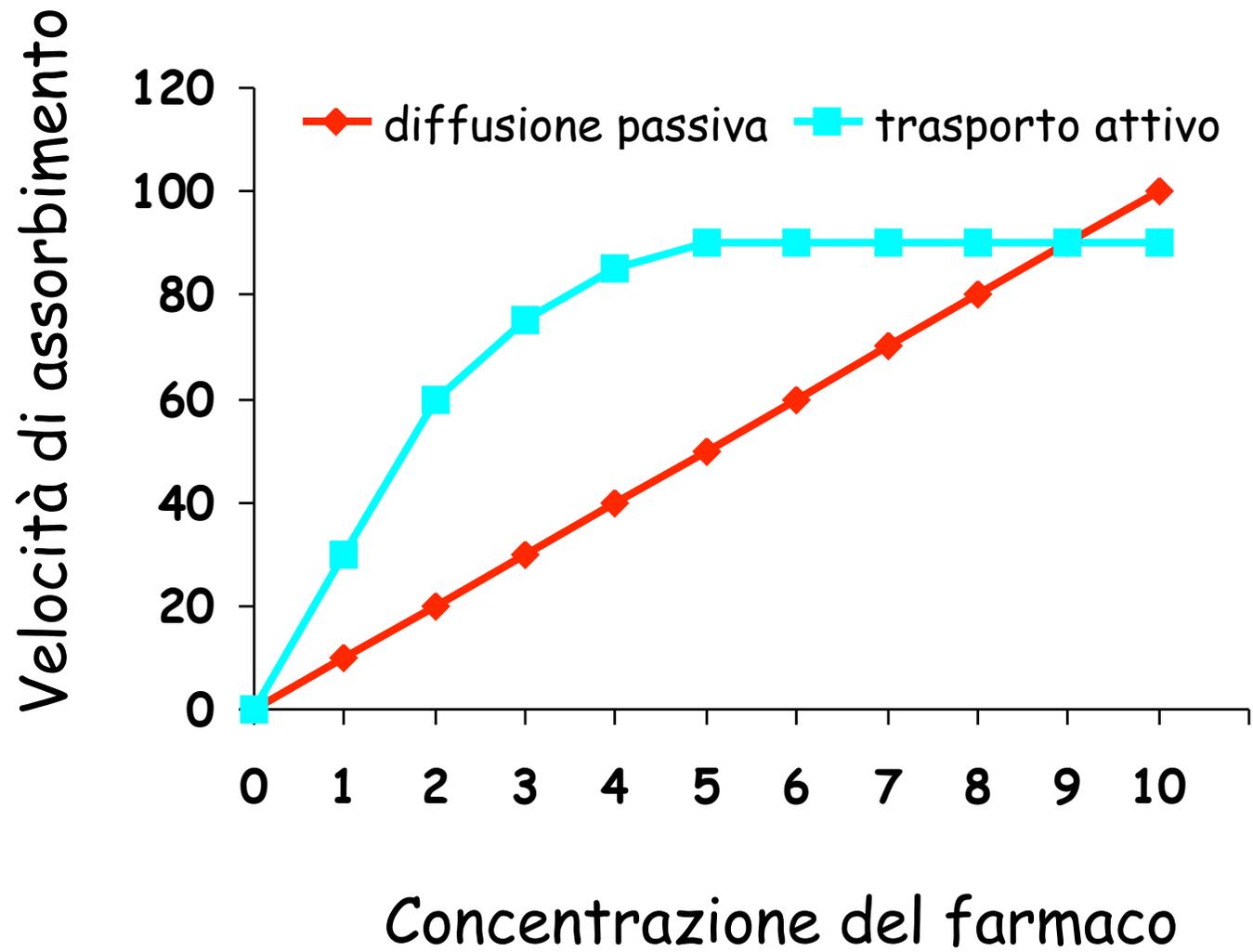
- È la modalità più frequente di passaggio dei farmaci attraverso le membrane
- non richiede consumo di energia
- non è selettiva
- è tanto più rapida e completa quanto più il farmaco è liposolubile



Trasporto attivo

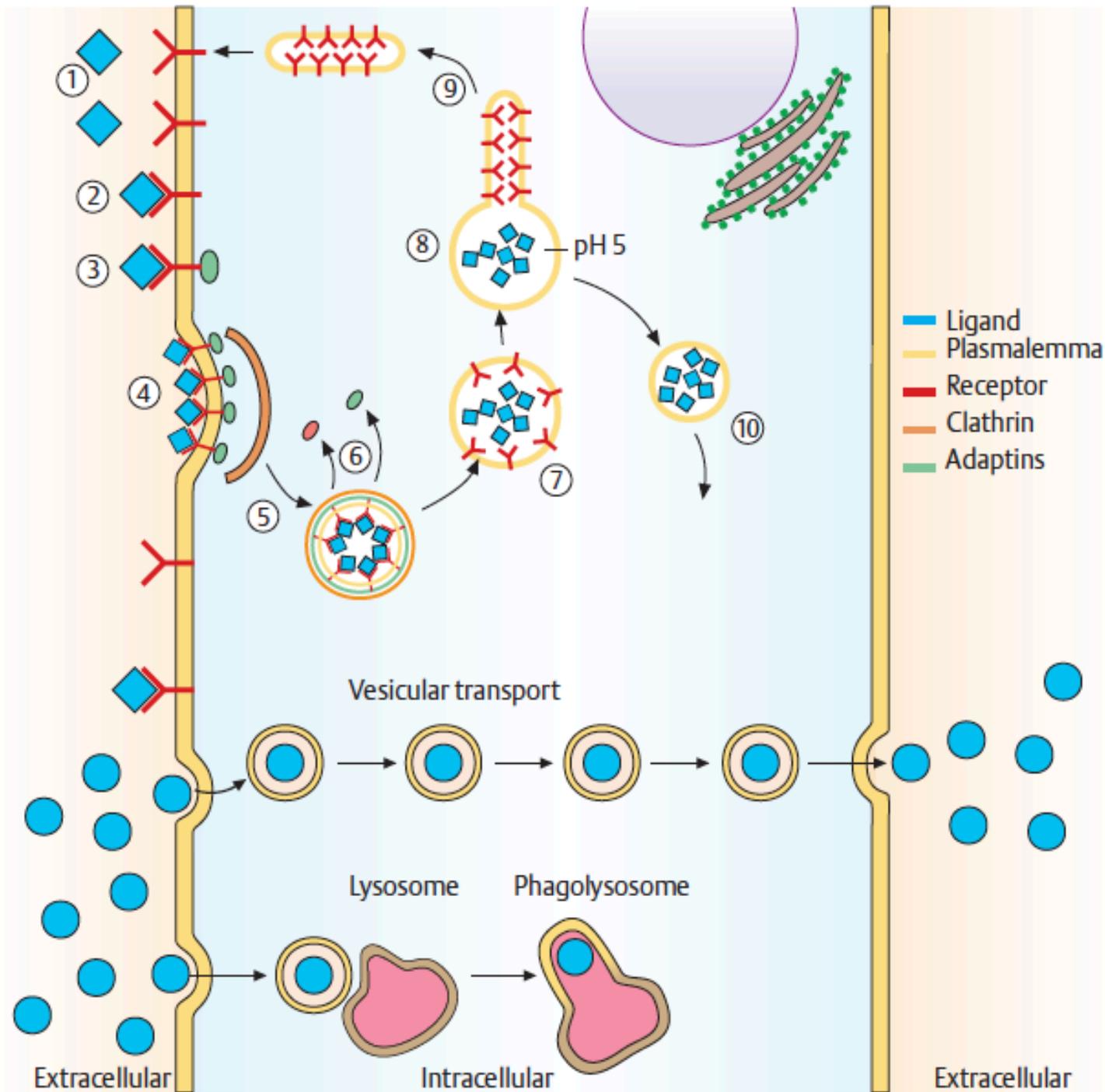
- È mediato da un carrier
- trasporta farmaci che sono analoghi di sostanze endogene (5-fluorouracile, l-dopa)
- trasporta contro gradiente e consuma energia
- è altamente selettivo ma molecole simili possono competere
- è saturabile

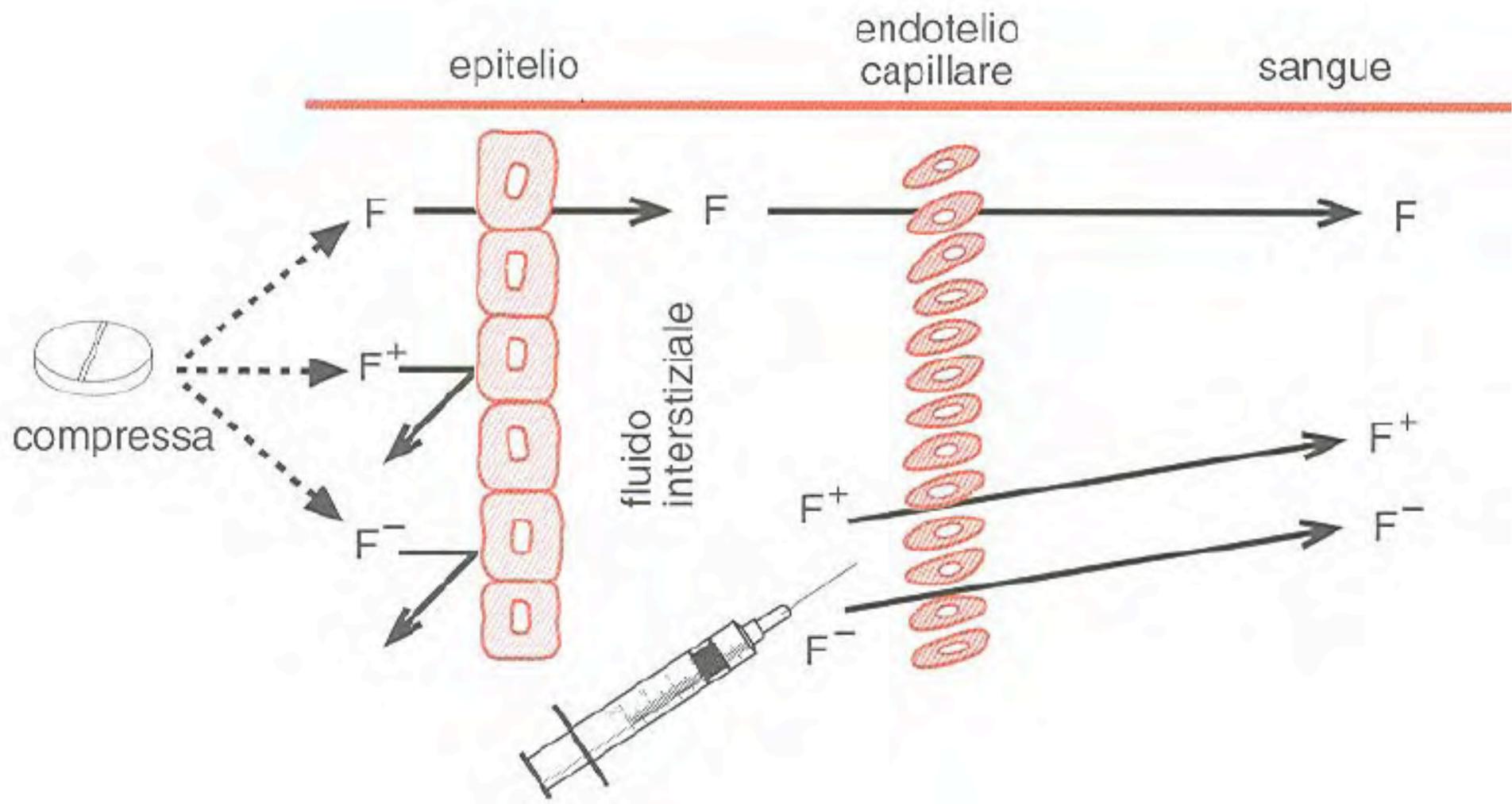


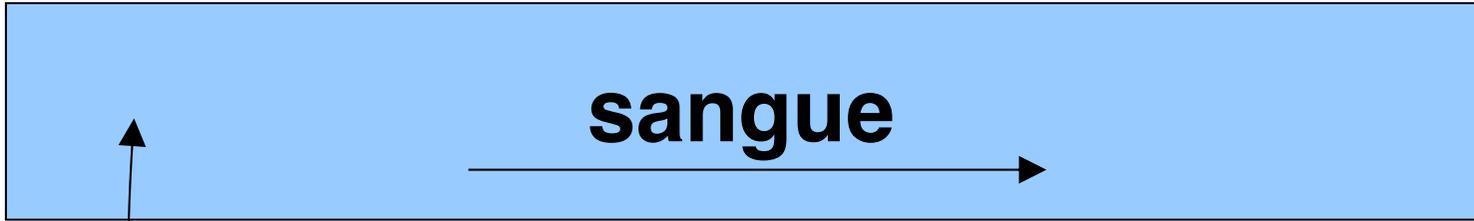


Endocitosi

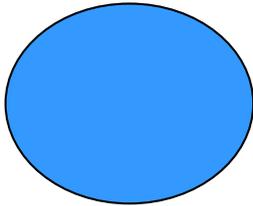
- Processo per cui porzioni di membrana cellulare, introflettendosi e chiudendosi su se stesse, si trasformano in vescicole intracellulari nelle quali rimangono intrappolati:
 1. Componenti della membrana stessa
 2. Sostanze dissolte nei fluidi extracellulari (fluid phase endocytosis)
 3. Sostanze legate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





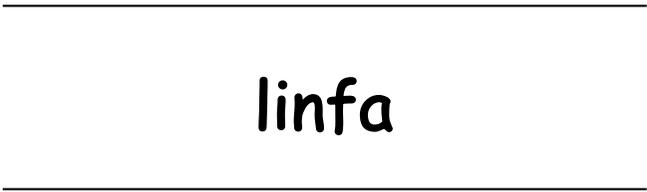


Farmaci a basso PM



Sito di iniezione

Farmaci ad alto PM



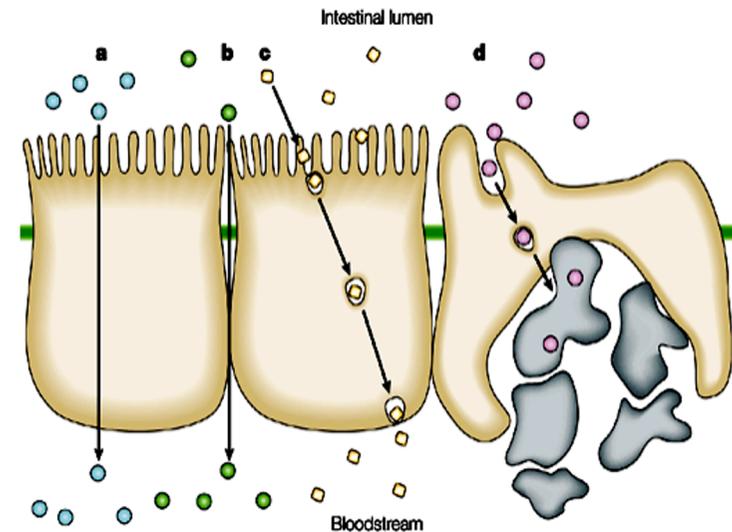
Farmacocinetica dei farmaci proteici e peptidici: **assorbimento**

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



Vie di somministrazione dei farmaci proteici

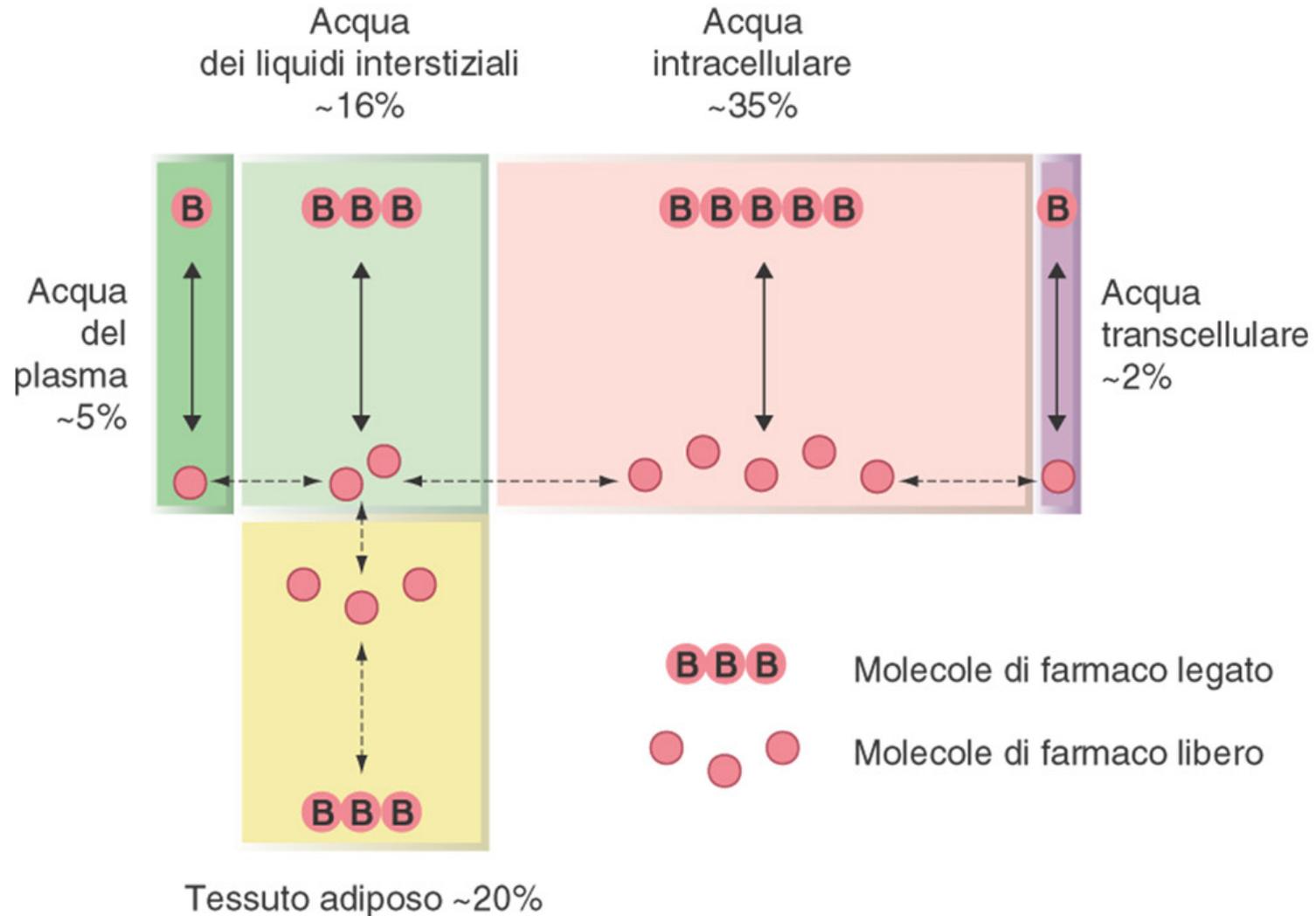
- Endovenosa (infliximab Remicade®...)
- Intramuscolare
- Sottocutanea (anakinra Kineret®, etanercept Enbrel®, adalimumab Humira®, insuline...)
- Intravitreale (ranibizumab Lucentis®, bevacizumab Avastin)

- 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

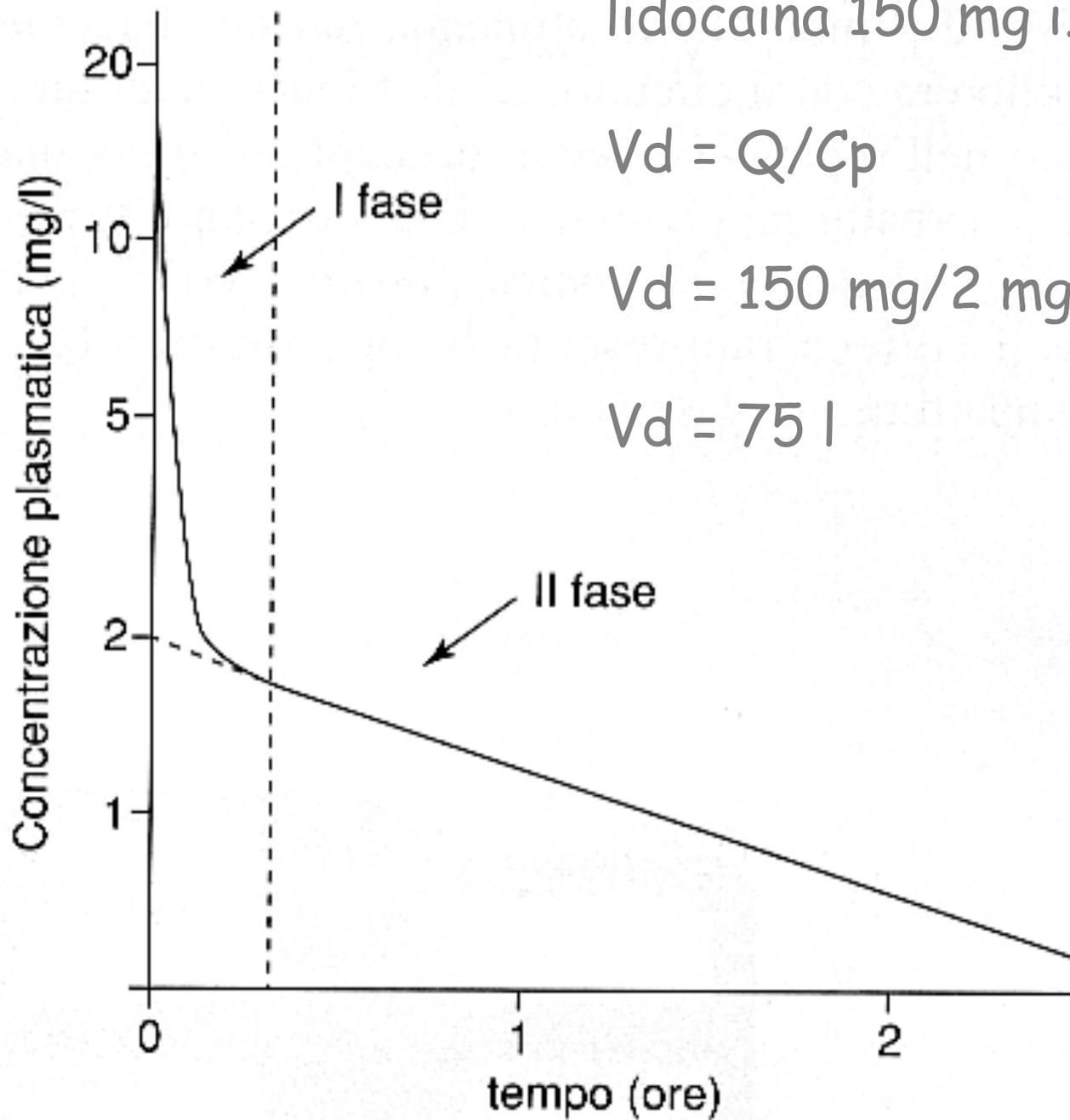
DISTRIBUZIONE DEI FARMACI



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.

$$V_d = Q/C_p$$

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

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

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