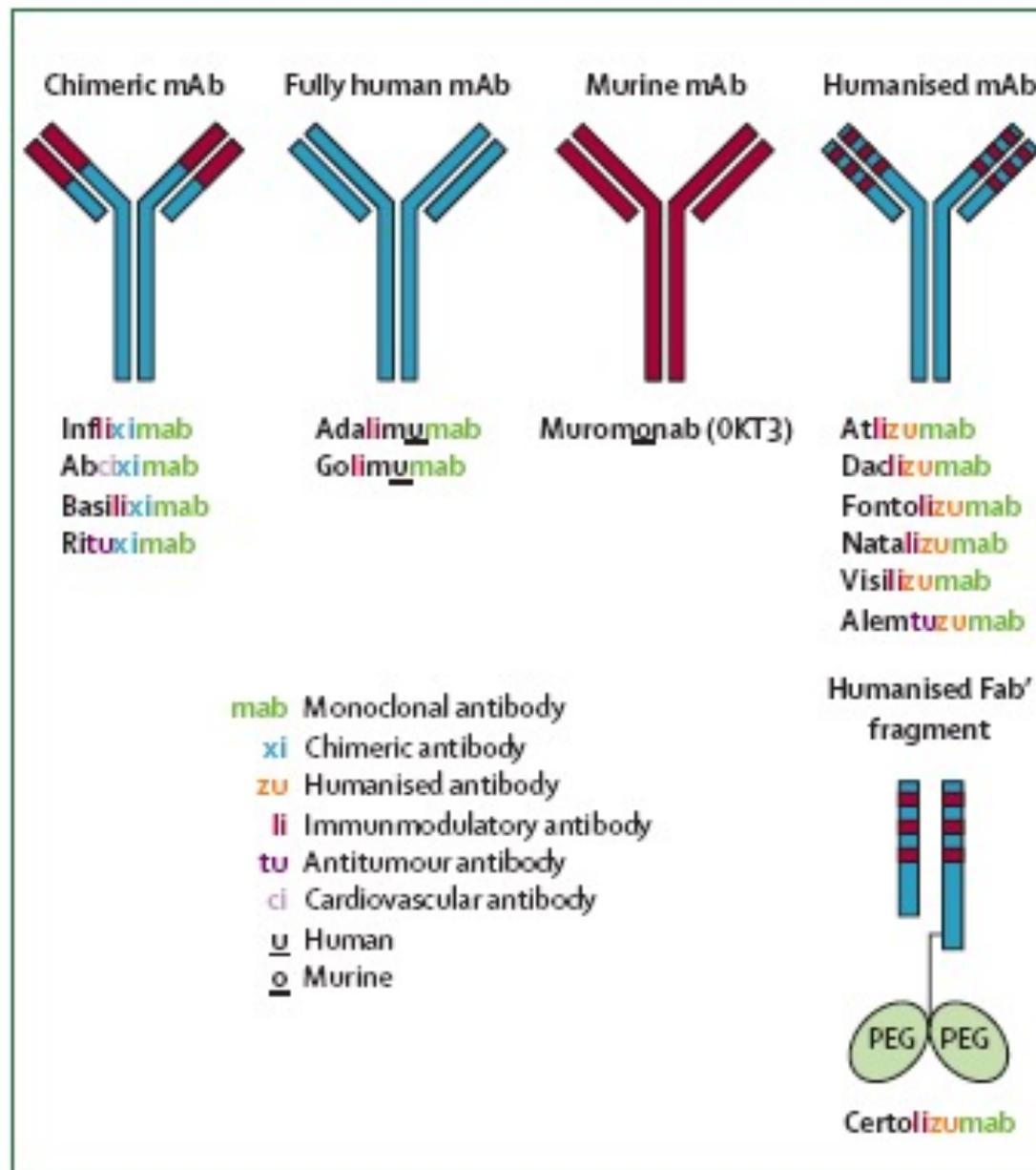


Anticorpi monoclonali: nomenclatura



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

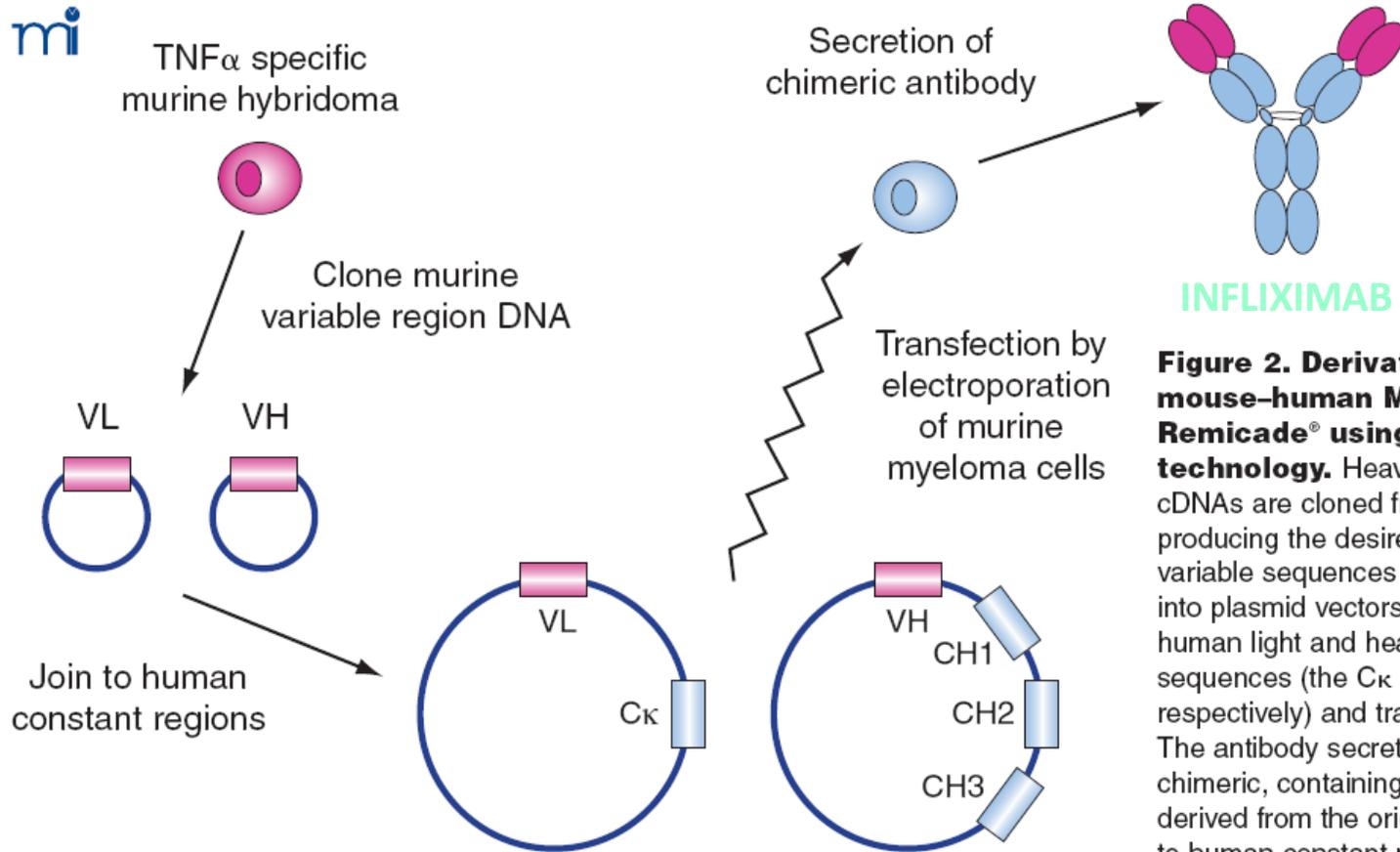


Figure 2. Derivation of chimeric mouse-human MABs such as Remicade[®] using recombinant DNA technology. Heavy and light chain variable cDNAs are cloned from a hybridoma cell clone producing the desired mouse MAb. These variable sequences (VL and VH) are inserted into plasmid vectors containing the desired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

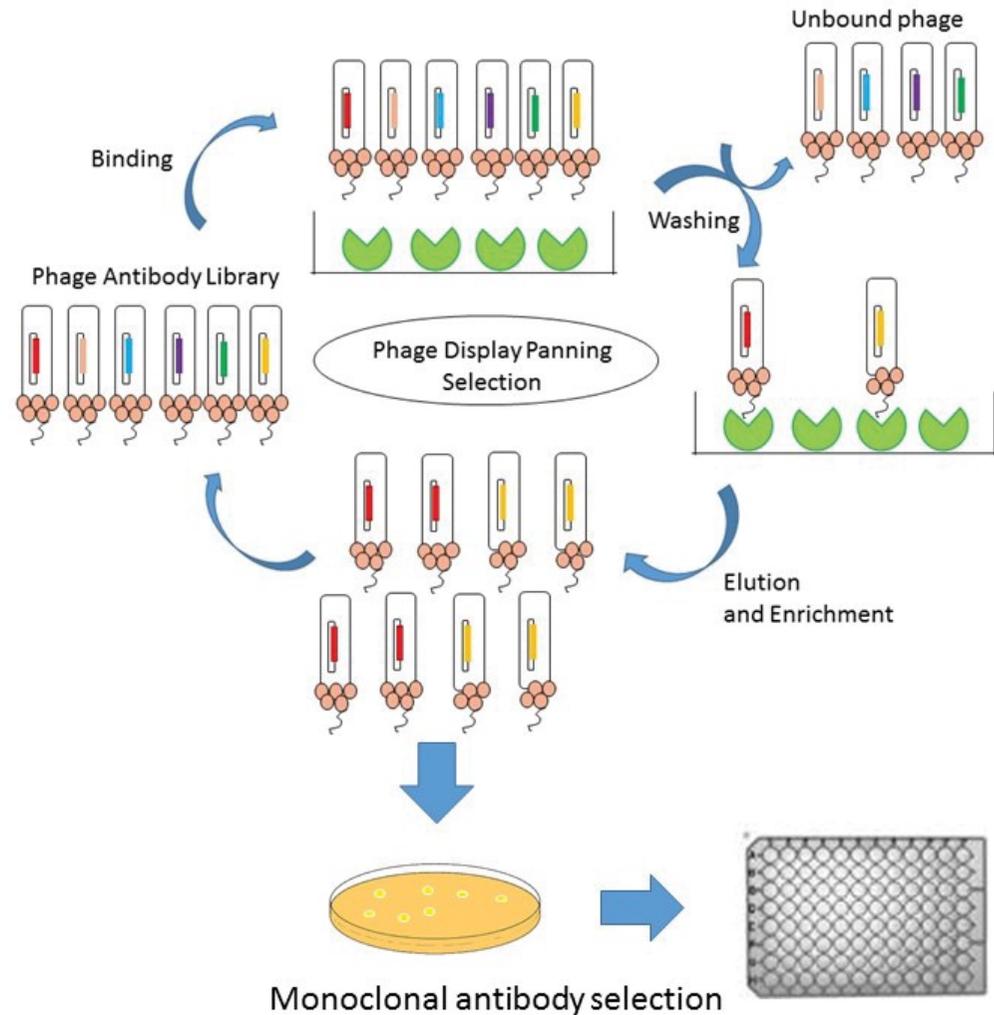
Possono essere prodotti impiegando due approcci:

- 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".



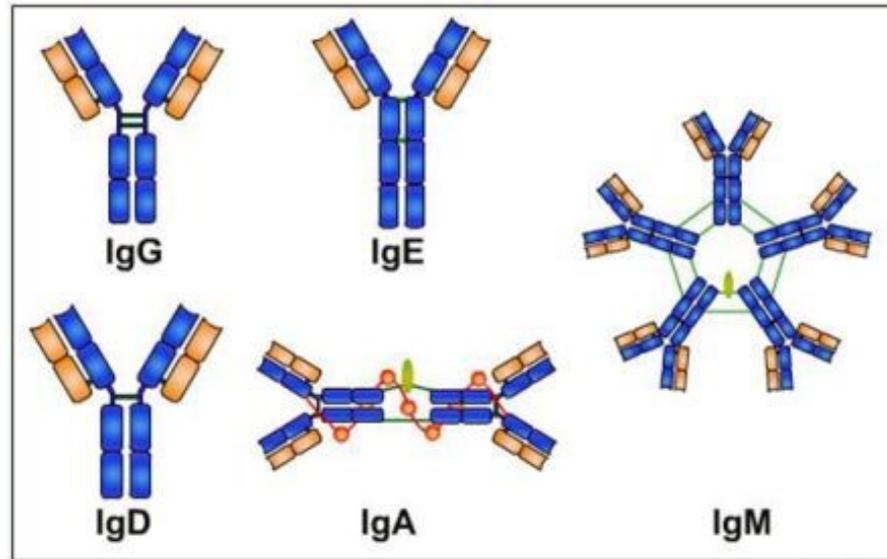
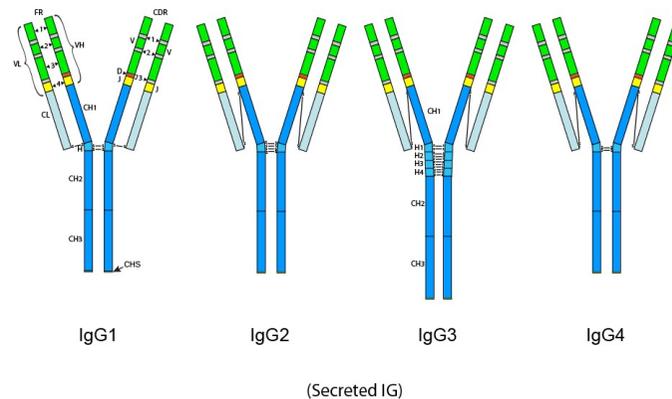


Tabella 10.1 Caratteristiche delle diverse classi di anticorpi.

	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



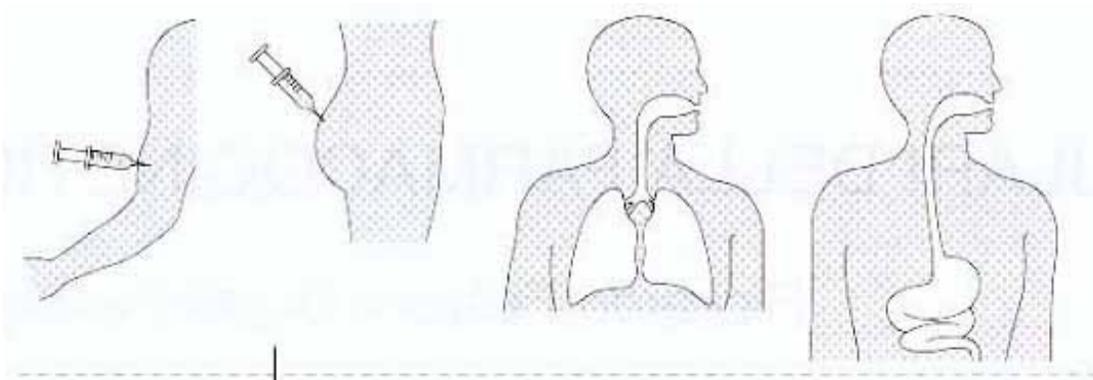
IgG subclass	Percentage in serum	Half life (days)	Binding affinity for FcγRIIa	Complement activation
IgG1	66	~21	+++	++
IgG2	23	~21	+/-	+
IgG3	7	~7	+++	+++
IgG4	4	~21	+ to -	-

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

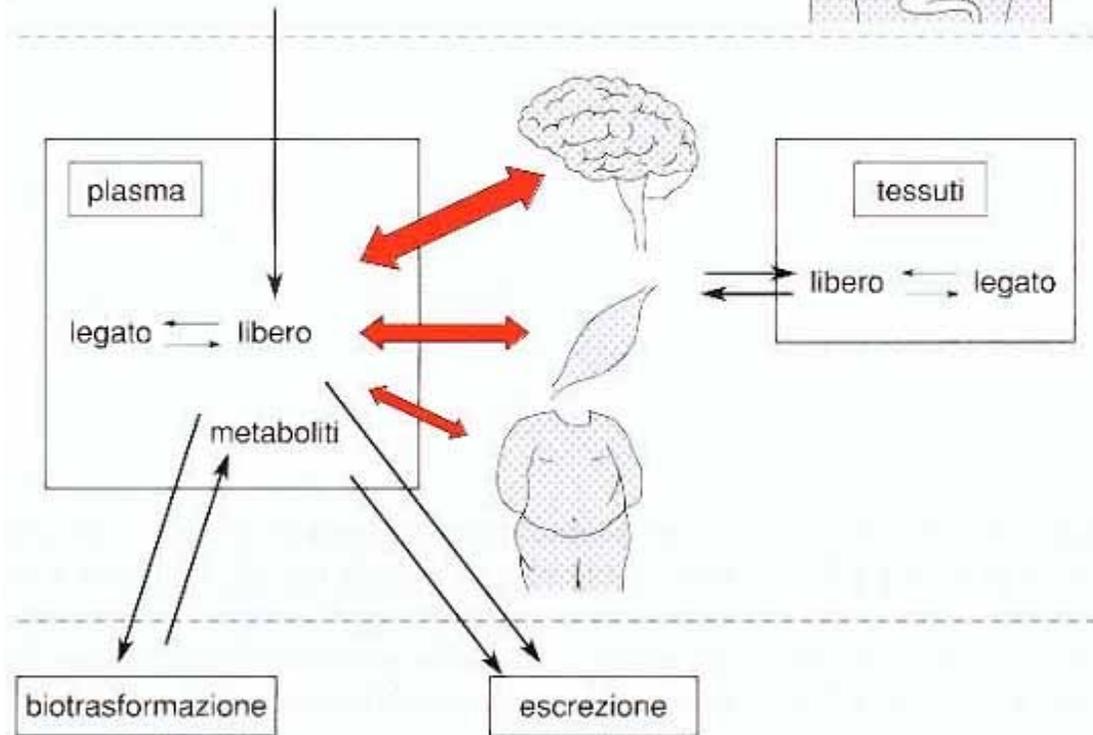
IgG2 e IgG4, non mediano la citotossicità, vengono scelti quando si vuole evitare la morte cellulare.

Farmacocinetica

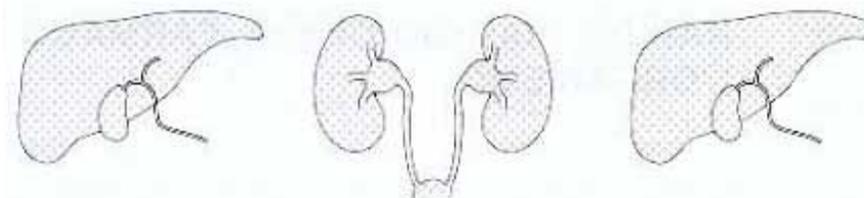
assorbimento



distribuzione



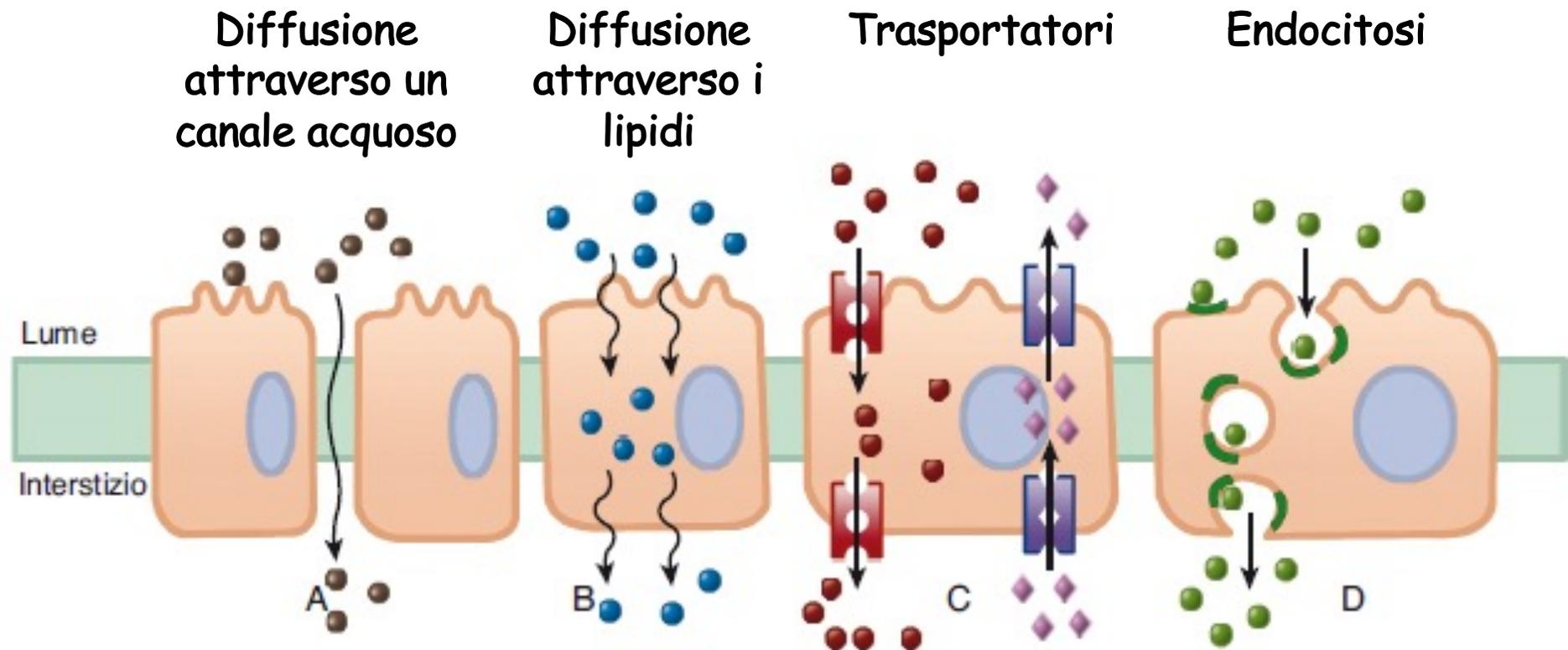
eliminazione



La complessità delle proteine

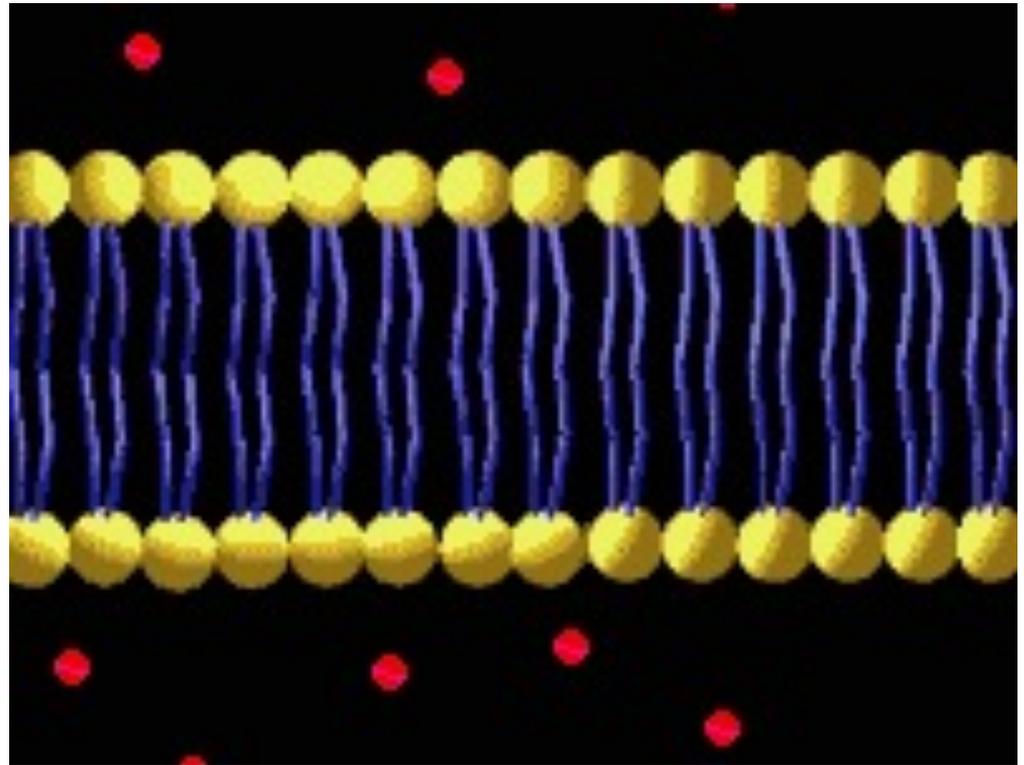
- Strutture molto **grandi e instabili**
- Struttura che si mantiene conformata con **forze di legame molto deboli**
- **Facile denaturazione** anche in condizioni non aggressive
- **Facilmente eliminate e distrutte dall'organismo**

Passaggio dei farmaci attraverso le membrane cellulari



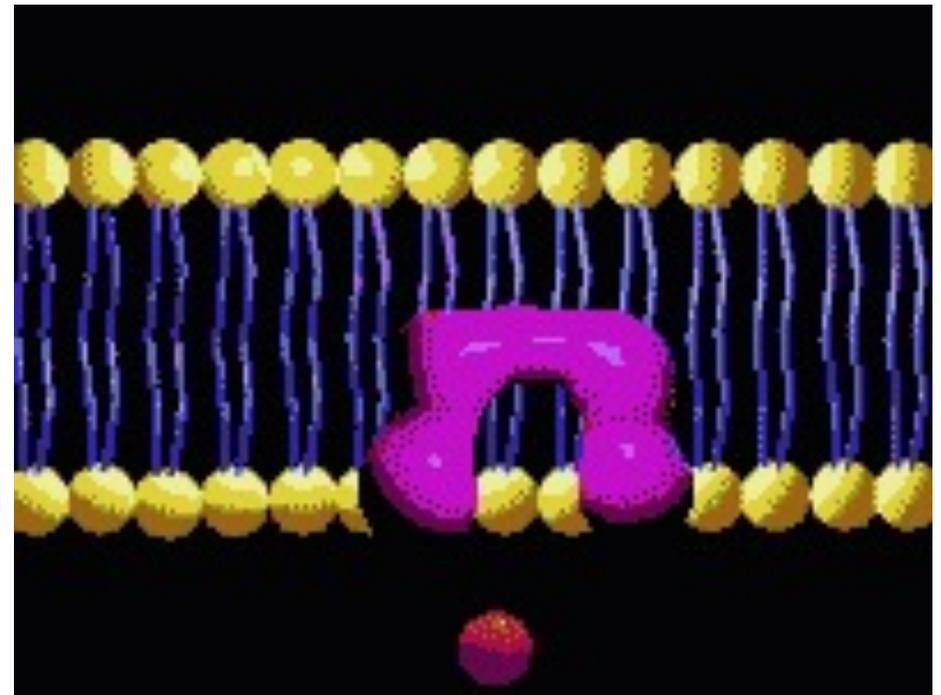
Diffusione semplice

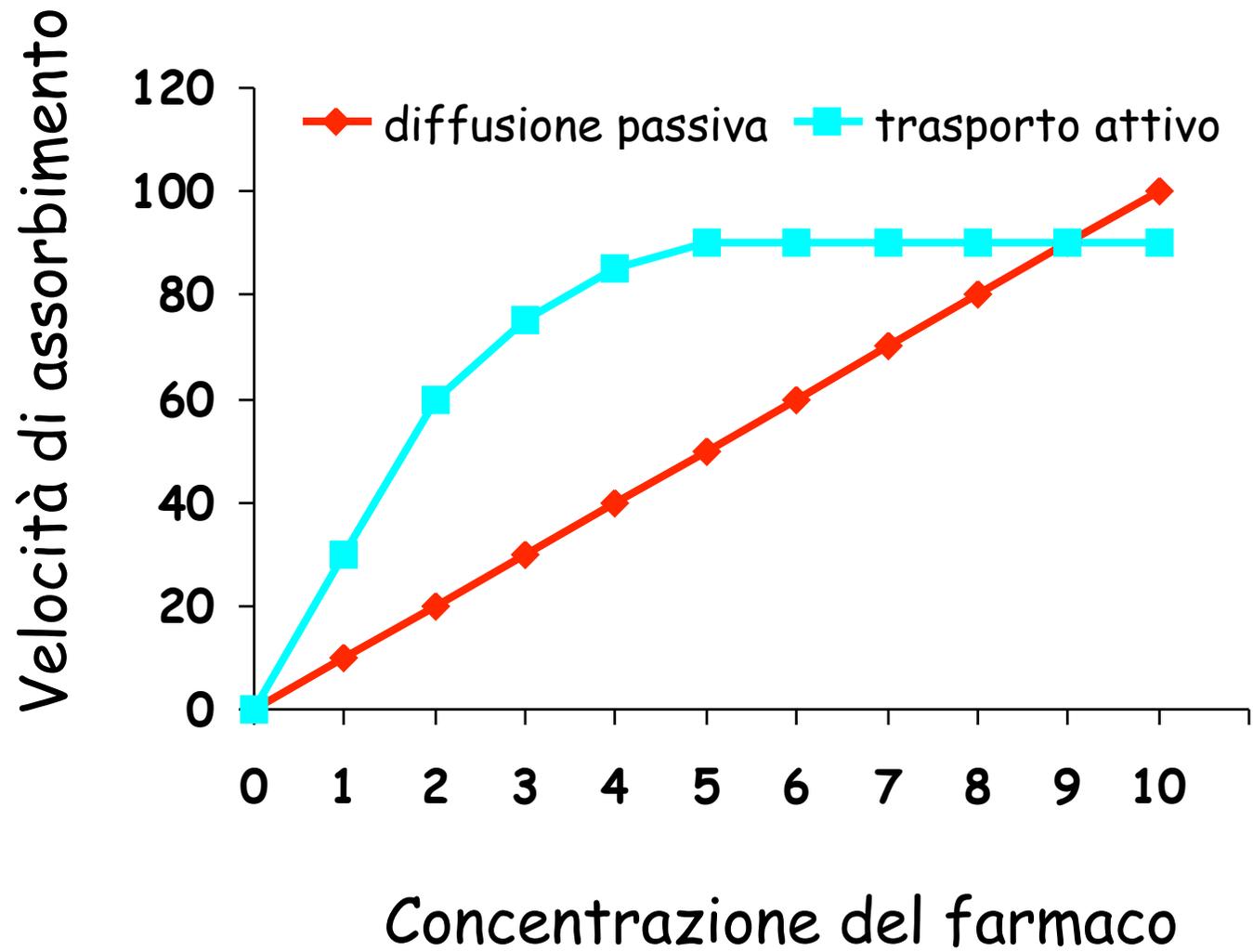
- È la modalità più frequente di passaggio dei farmaci attraverso le membrane
- non richiede consumo di energia
- non è selettiva
- è tanto più rapida e completa quanto più il farmaco è liposolubile



Trasporto attivo

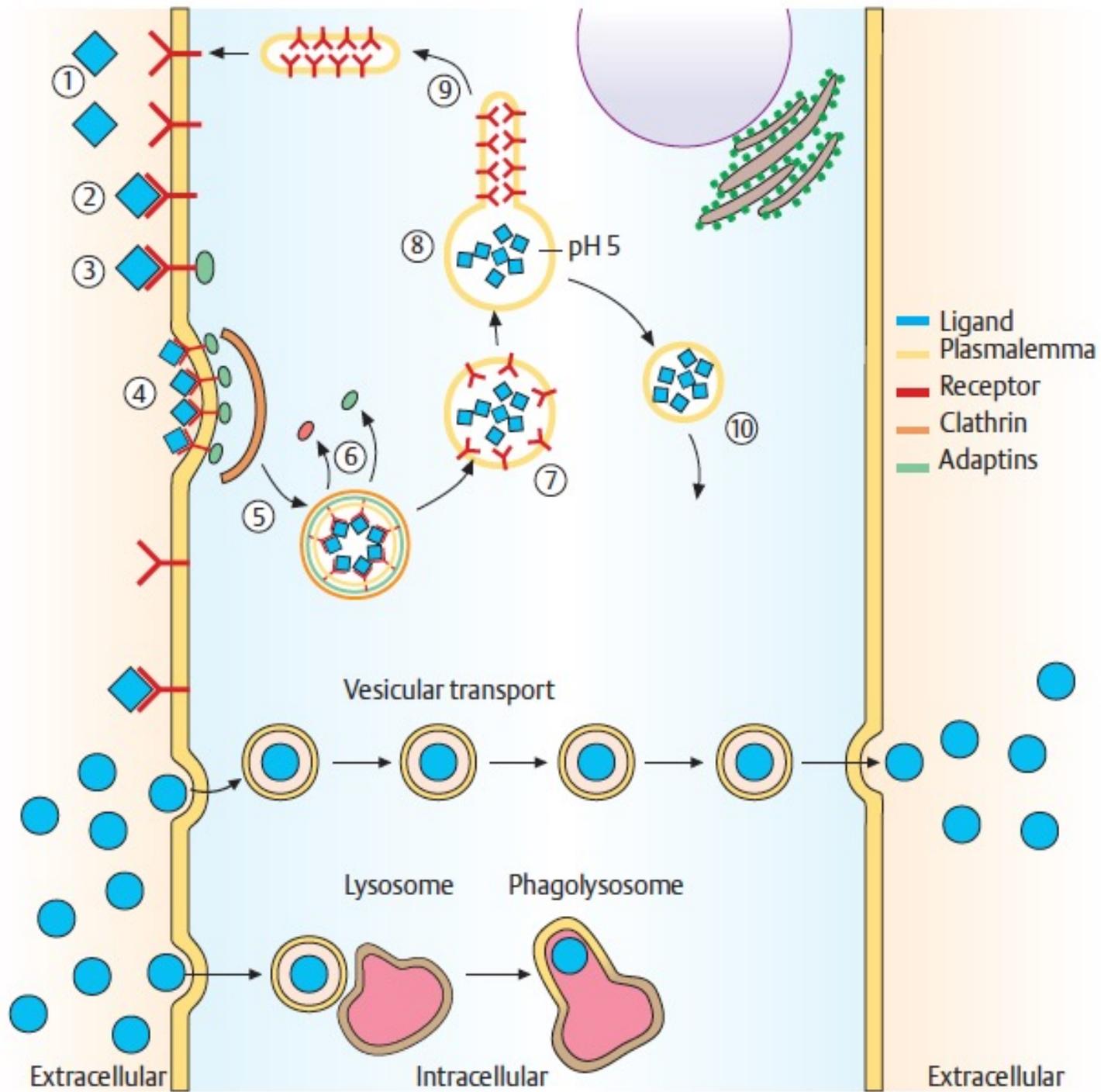
- È mediato da un carrier
- trasporta farmaci che sono analoghi di sostanze endogene (5-fluorouracile, l-dopa)
- trasporta contro gradiente e consuma energia
- è altamente selettivo ma molecole simili possono competere
- è saturabile

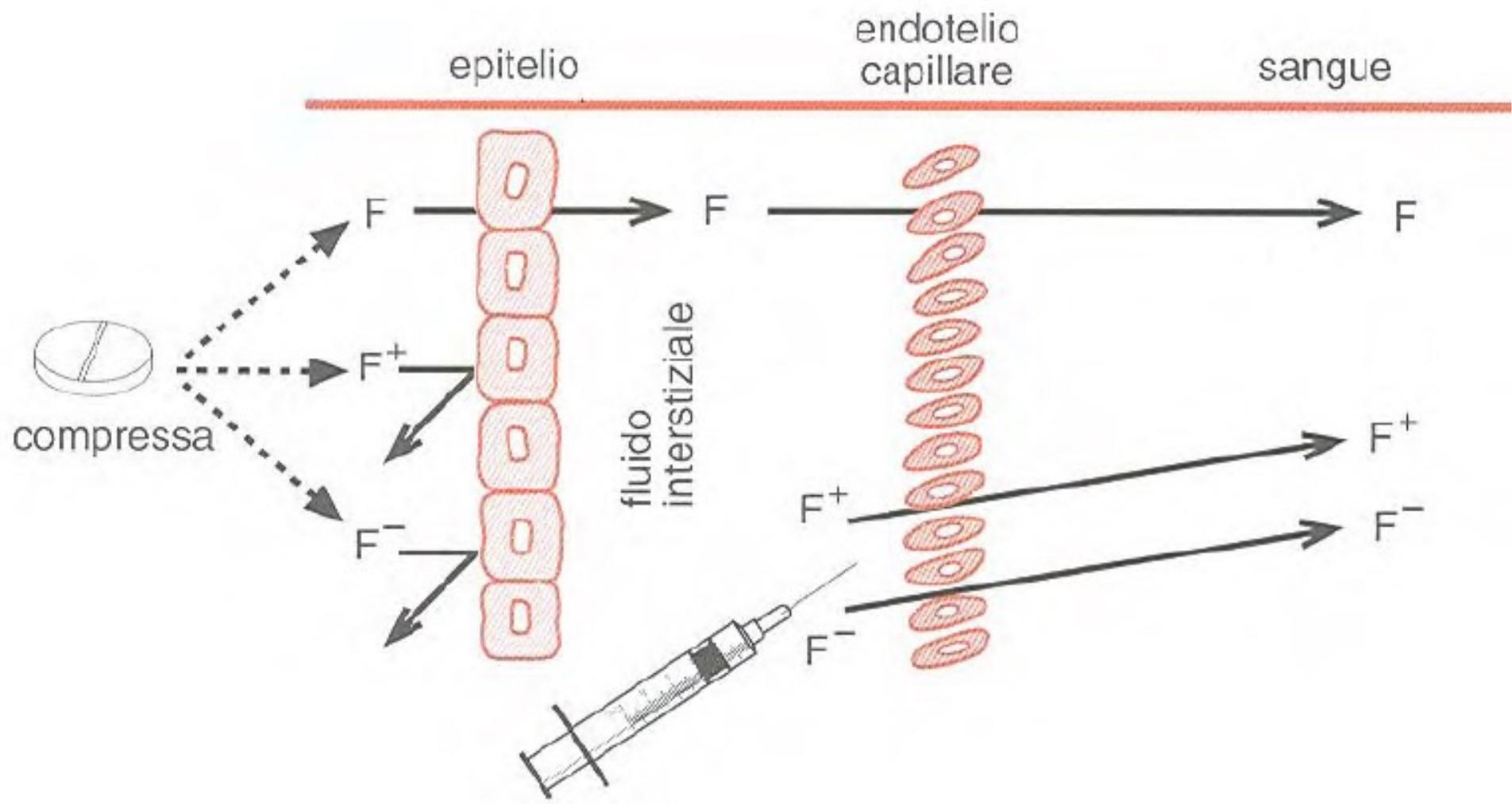


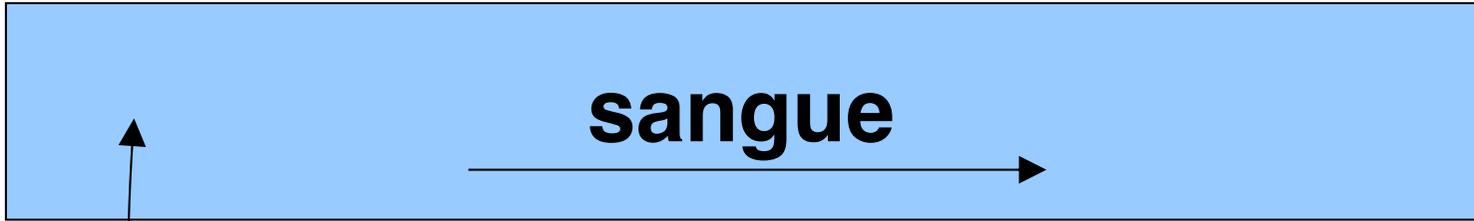


Endocitosi

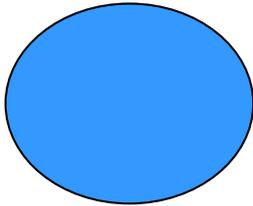
- Processo per cui porzioni di membrana cellulare, introflettendosi e chiudendosi su se stesse, si trasformano in vescicole intracellulari nelle quali rimangono intrappolati:
 1. Componenti della membrana stessa
 2. Sostanze dissolte nei fluidi extracellulari (fluid phase endocytosis)
 3. Sostanze legate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





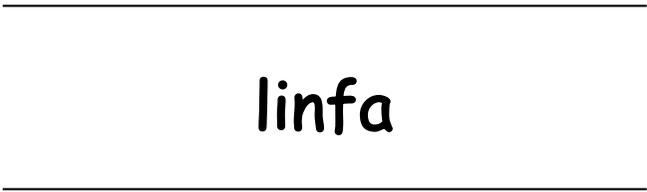


Farmaci a basso PM



Sito di iniezione

Farmaci ad alto PM



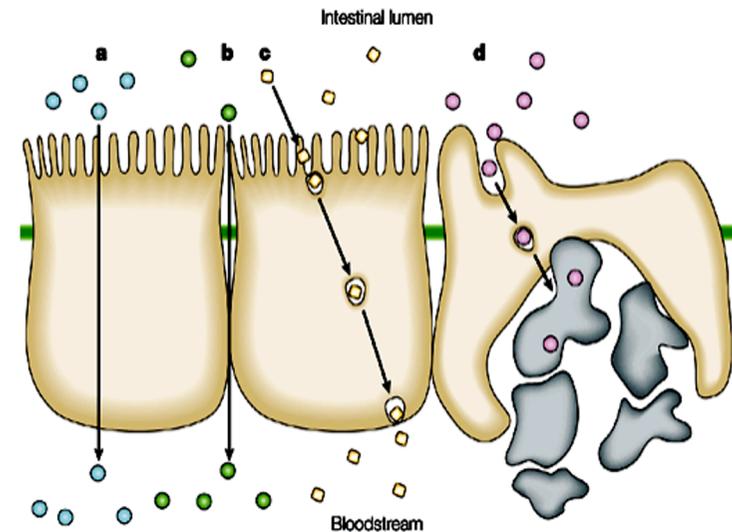
Farmacocinetica dei farmaci proteici e peptidici: **assorbimento**

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

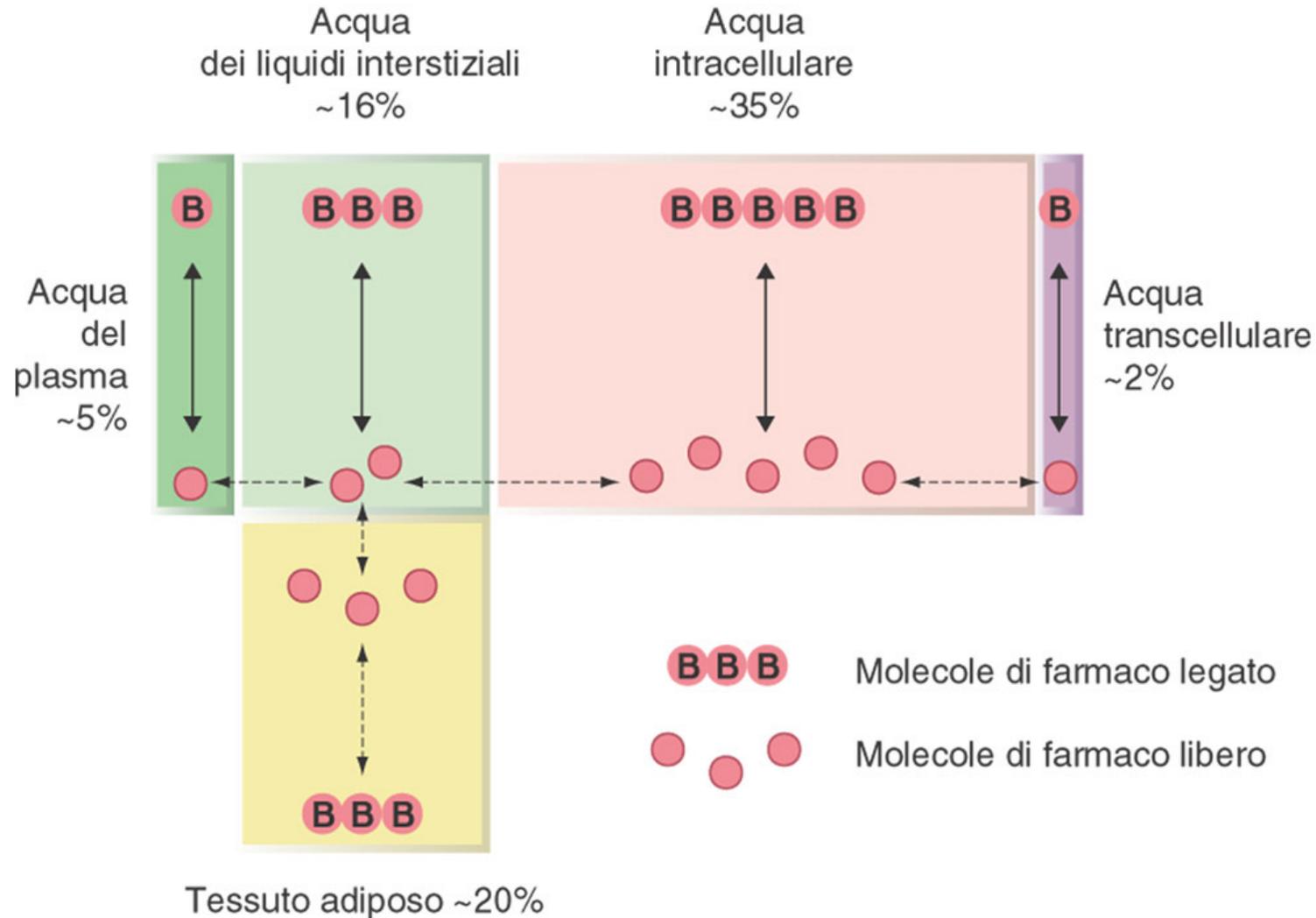
- Endovenosa (infliximab Remicade®...)
- Intramuscolare
- Sottocutanea (anakinra Kineret®, etanercept Enbrel®, adalimumab Humira®, insuline...)
- Intravitreale (ranibizumab Lucentis®, bevacizumab Avastin)

- 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

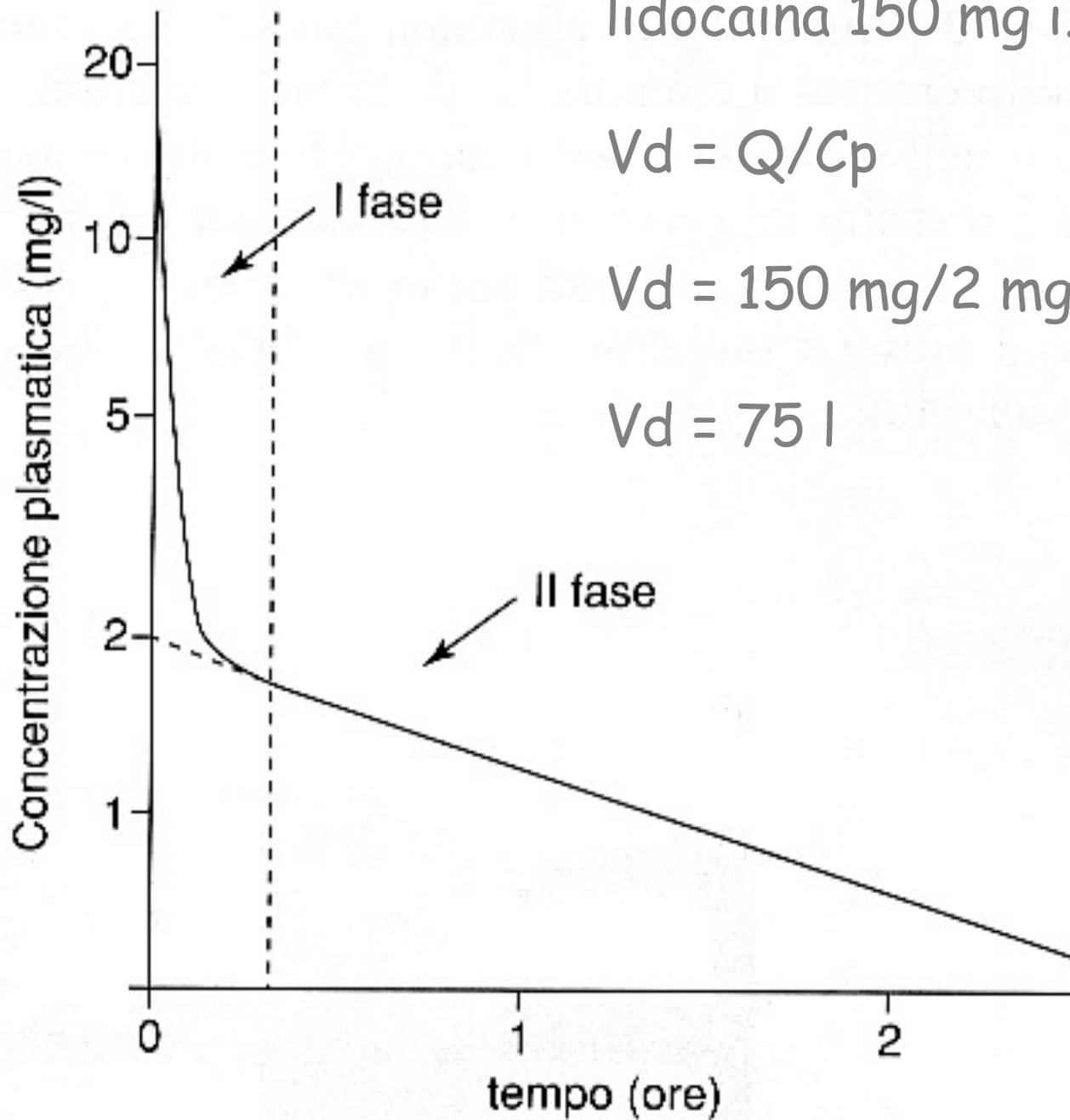
DISTRIBUZIONE DEI FARMACI



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.

$$V_d = Q/C_p$$

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

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

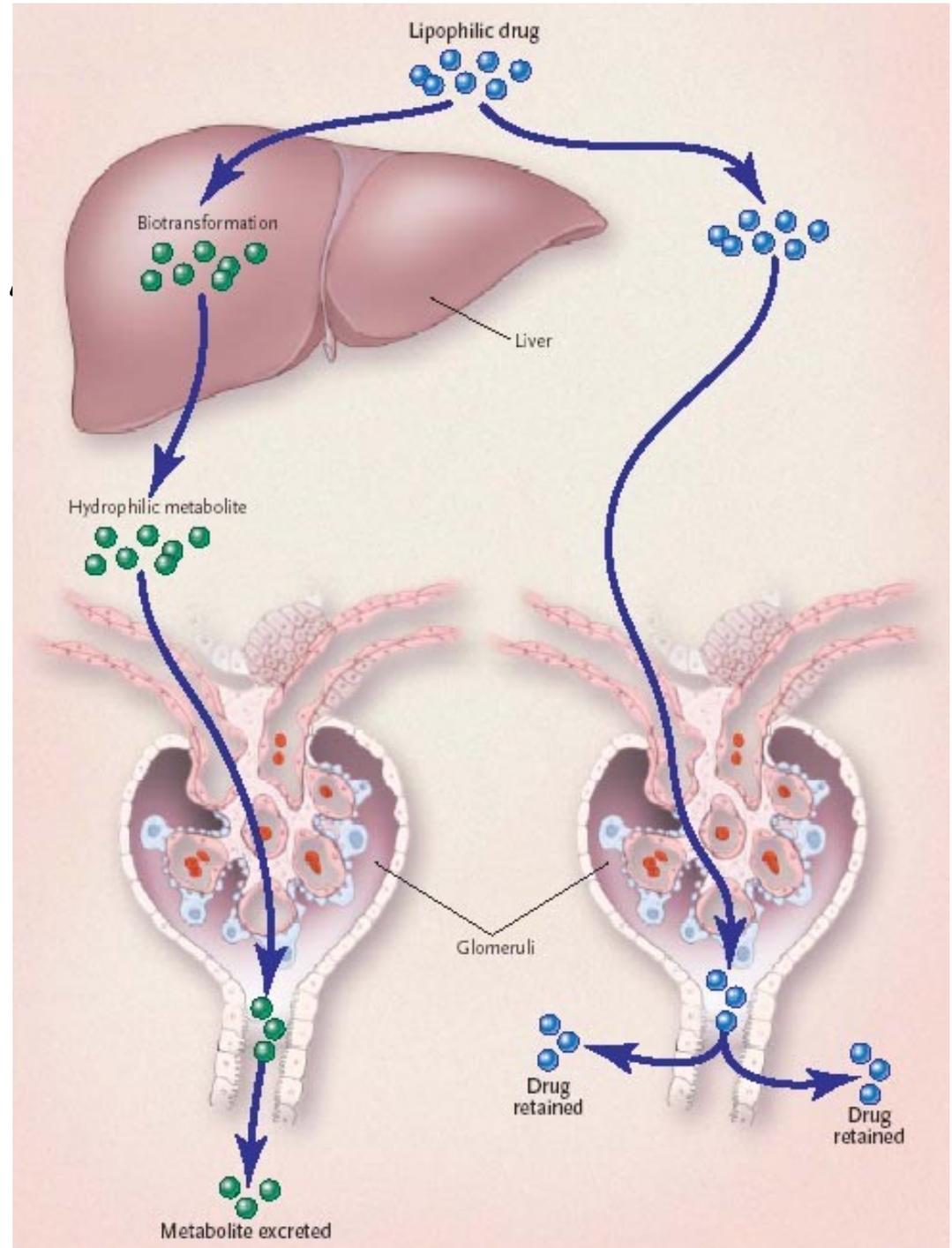
Distribuzione dei farmaci proteici e peptidici

- 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

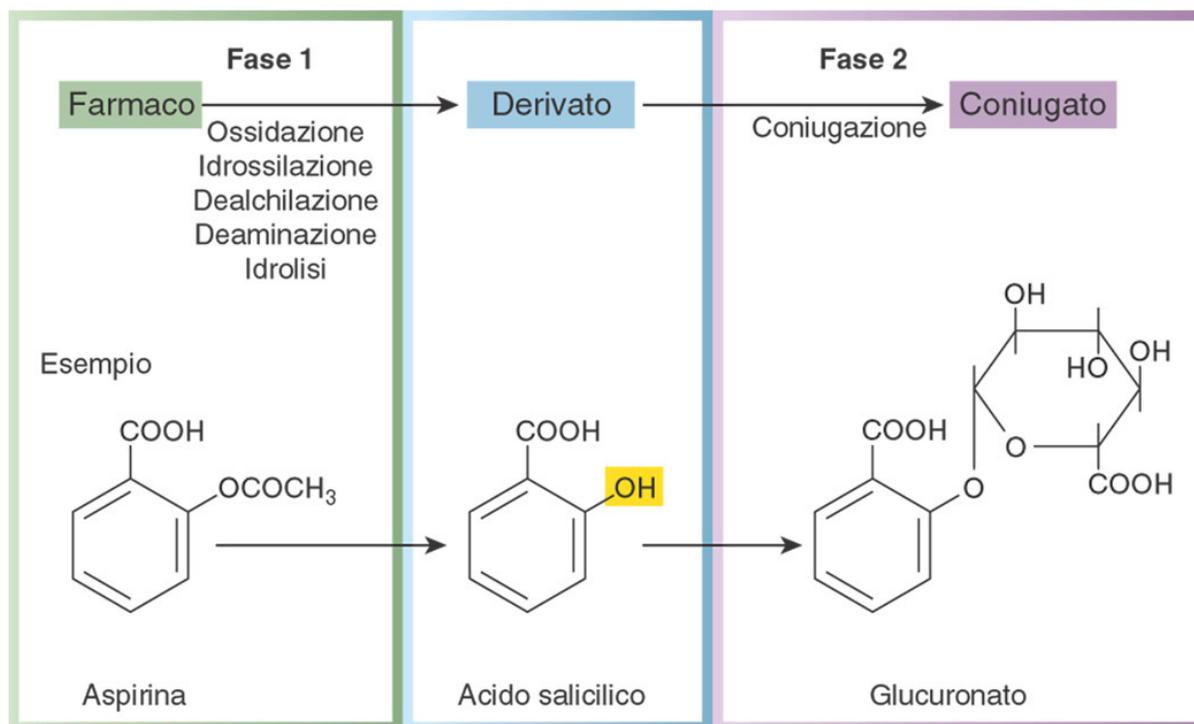
Biotrasformazione

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

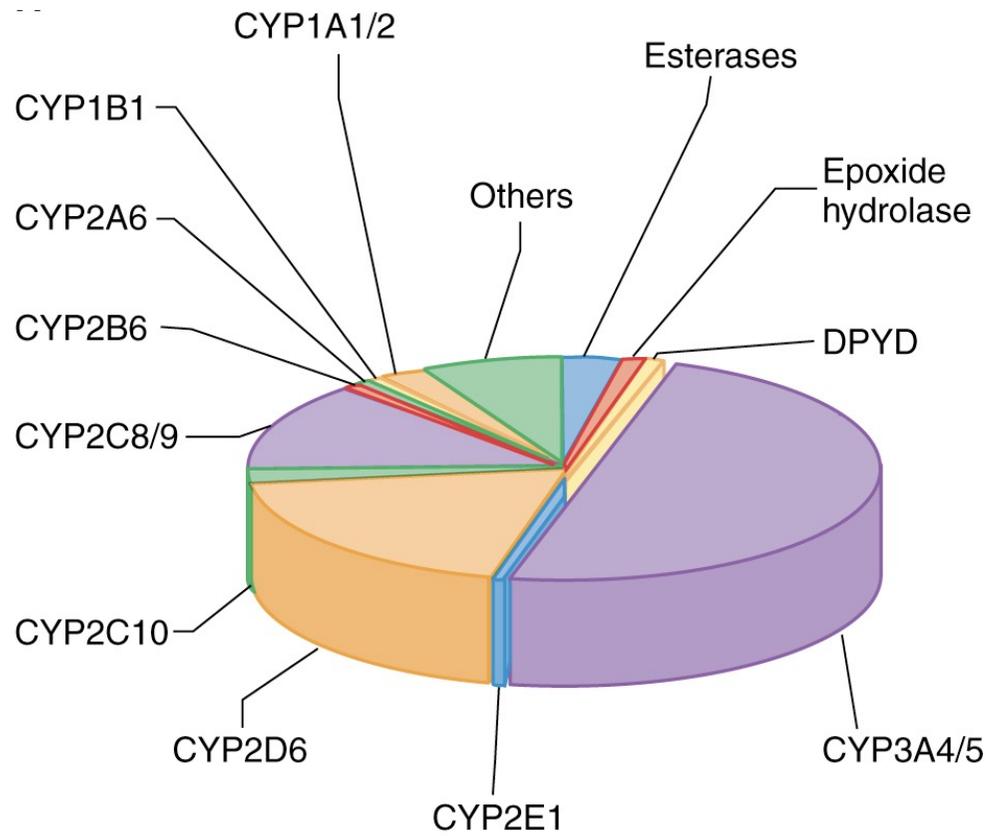


Metabolismo dei farmaci

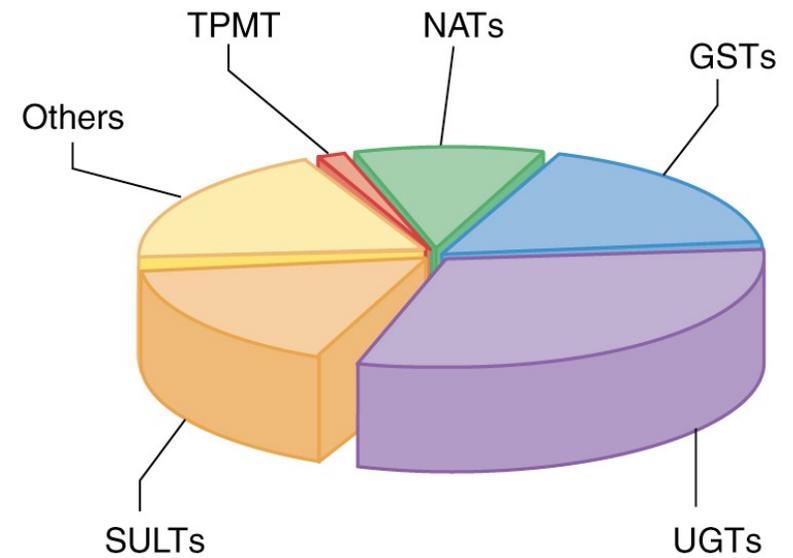
- **Reazioni di fase I o di funzionalizzazione:** hanno la finalità di inserire o mettere in evidenza gruppi funzionali di legame (-OH, -SH, -NH₂, -COOH) per le reazioni di coniugazione. Dal punto di vista chimico sono prevalentemente reazioni di ossidazione, riduzione, idrolisi
- **Reazioni di fase II o di coniugazione:** glicuroconiugazione, solfatazione, metilazione, acetilazione, coniugazione con aminoacidi, con glutatione....



Reazioni di fase 1



Reazioni di fase 2



Eliminazione

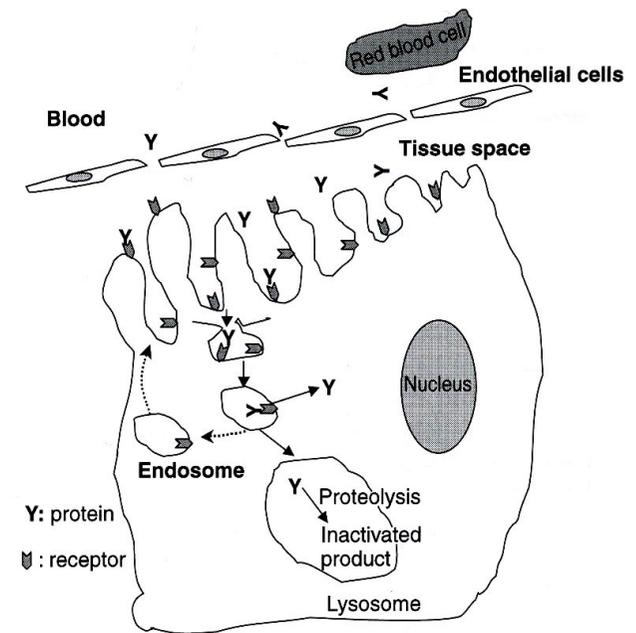
Molecular weight	Elimination site	Predominant elimination mechanisms	Major determinant
< 500	Blood, liver	Extracellular hydrolysis Passive lipid diffusion	Structure, lipophilicity
500–1,000	Liver	Carrier-mediated uptake Passive lipid diffusion	Structure, lipophilicity
1,000–50,000	Kidney	Glomerular filtration 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	α_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

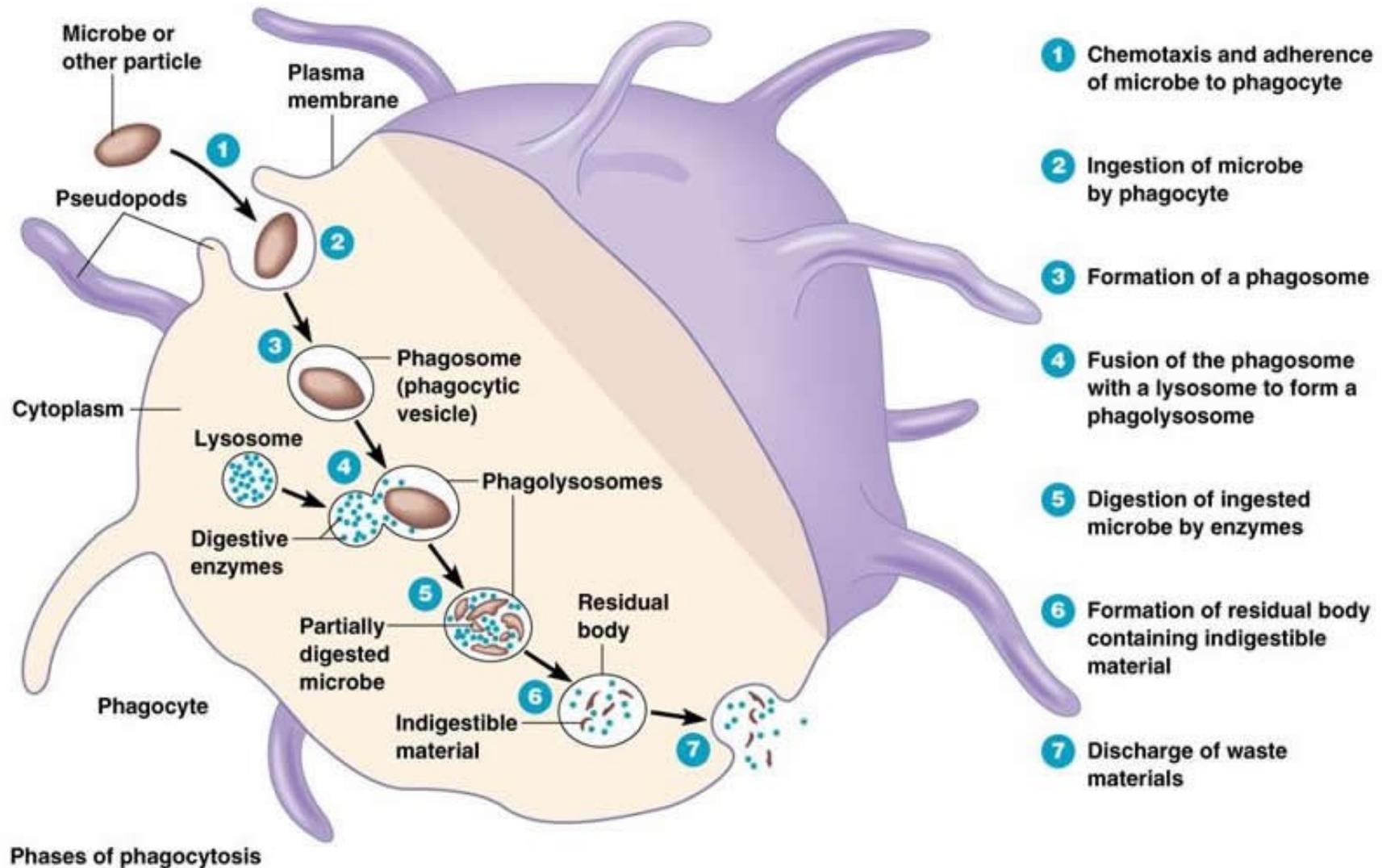
- Entrano negli epatociti per endocitosi mediata da recettore (insulina, epidermal growth factor, glicoproteine)
- Vengono metabolizzate all'interno degli epatociti nei lisosomi (endopeptidasi poi esopeptidasi)

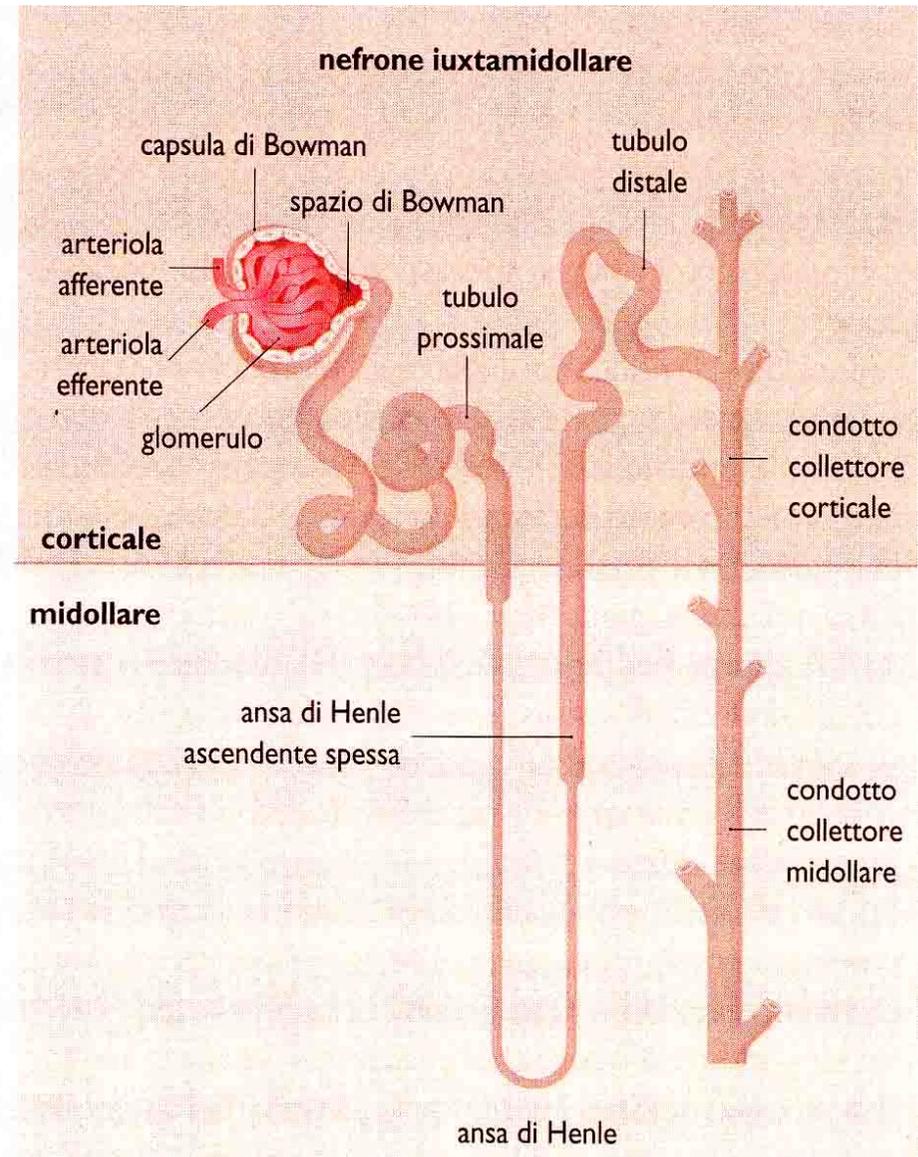
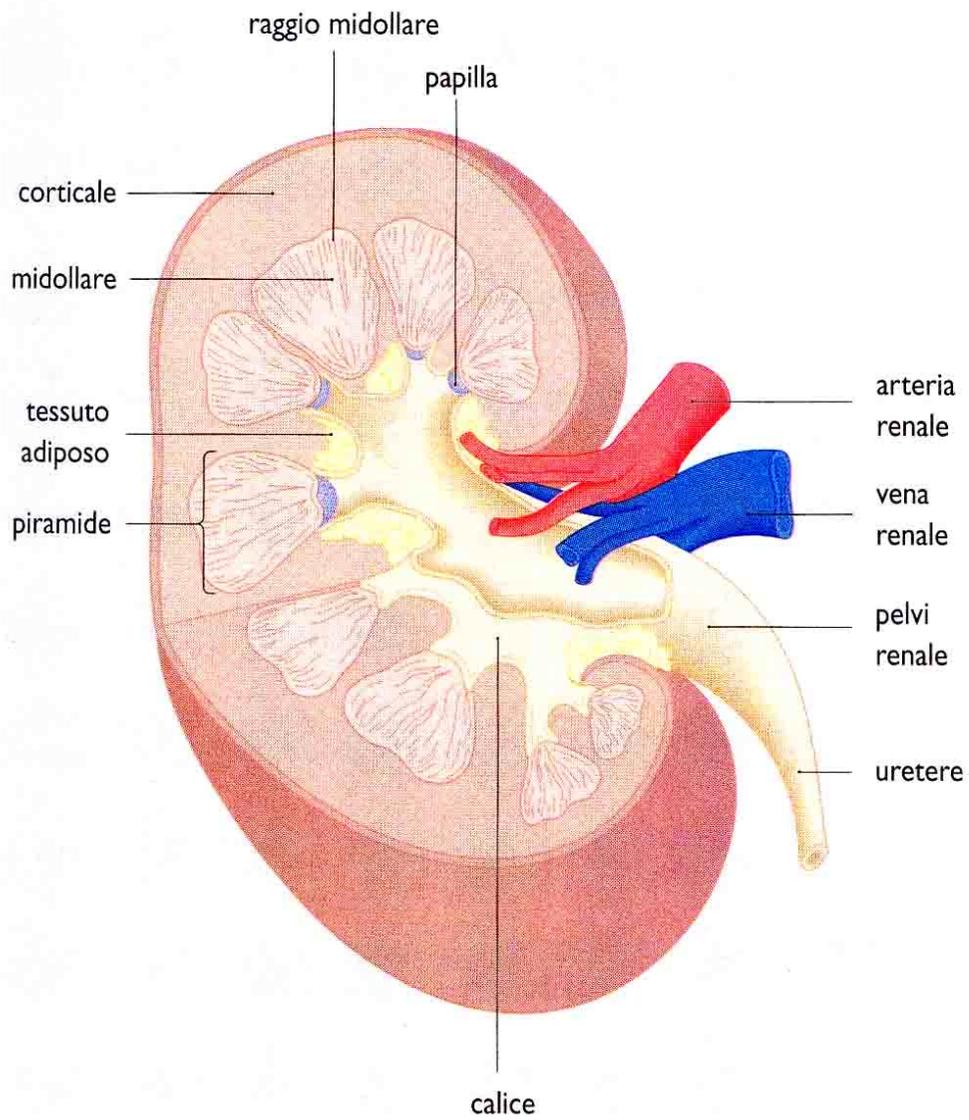


Eliminazione recettore mediata ad opera di altre cellule

- 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

Fagocitosi





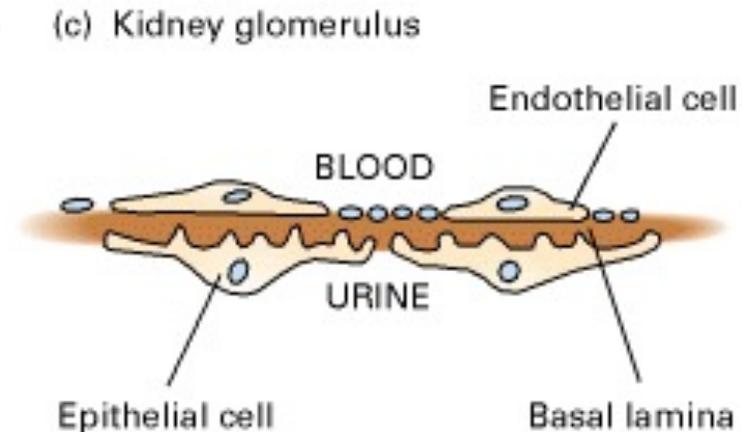
Escrezione renale: filtrazione

- Ogni giorno attraverso i reni passano circa 850 l di sangue (50 volte il volume dei liquidi extracellulari, 17 l)
- Circa il 20% del plasma che circola attraverso i reni viene filtrato
- il volume di preurina prodotto in 24 ore è di circa 170 l (20% di 850 l)
- il 65% viene riassorbito nel tubulo contorto prossimale, il 15% lungo la branca discendente dell'ansa di Henle, il 19% in parti uguali nel tubulo contorto distale e nel dotto collettore
- l'1% dell'ultrafiltrato viene escreto nelle urine (1.7 l)

Filtrazione glomerulare

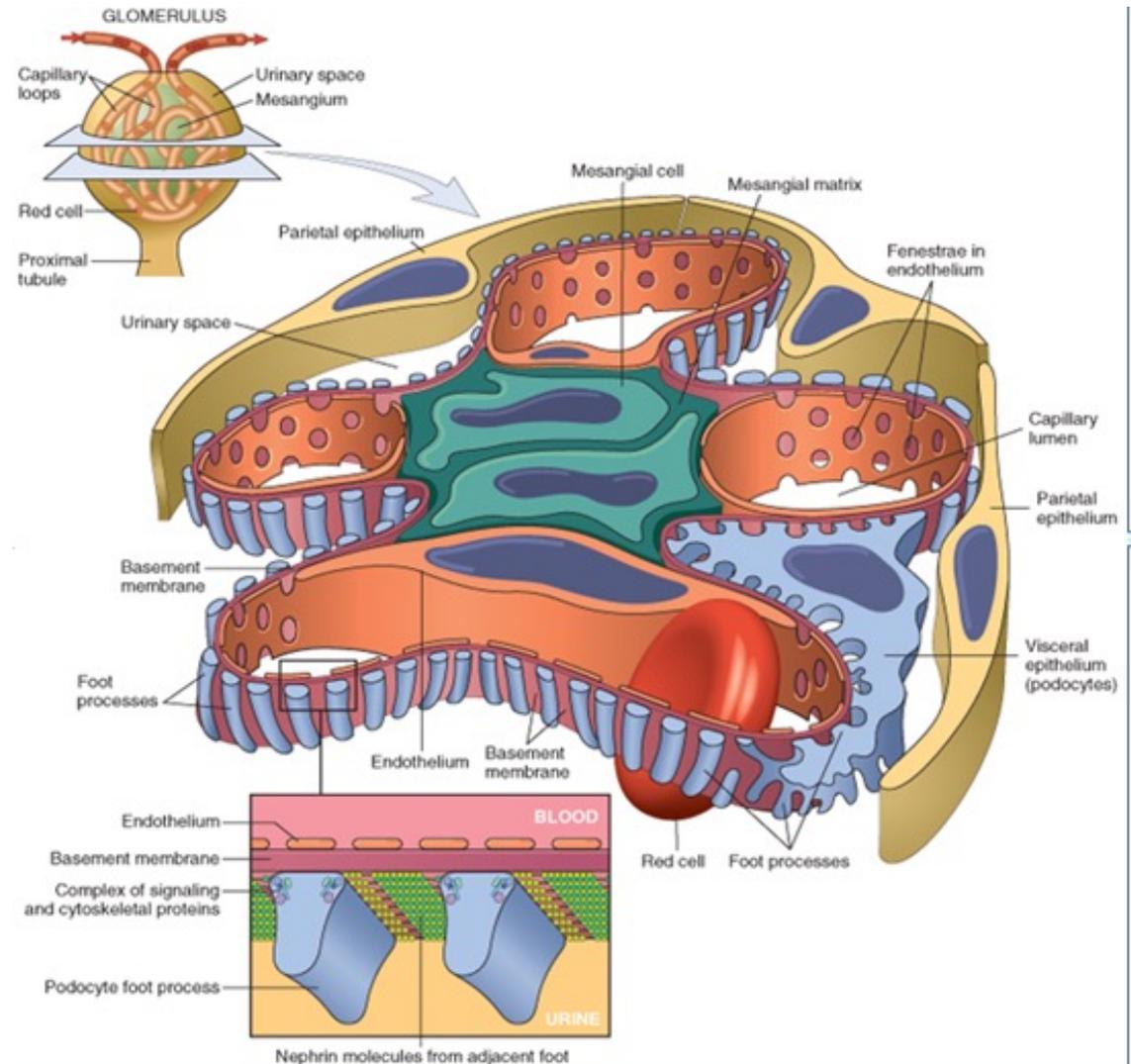
Il filtro glomerulare è costituito da tre strati che separano il lume dei capillari dallo spazio nella capsula di Bowman

- endotelio capillare: presenta ampie fenestrature con un diametro di 50-100 nm (non passano le cellule ematiche)
- lamina basale: reticolo tridimensionale di glicoproteine dotate di forte carica polianionica immerso in una matrice omogenea
- podociti dell'epitelio della capsula di Bowman: formano delle fessure di filtrazione di 20-50 nm, ma sono ulteriormente ricoperti dal glicocalice che permette il passaggio di molecole con raggio effettivo $< 1,5$ nm, ed è praticamente impermeabile a molecole con raggio $> 4,5$ nm. In pratica non vengono filtrate molecole con un PM > 60 kDa (passano bene quelle con pM < 20 kDa). Macromolecole polianioniche passano con maggior difficoltà rispetto a molecole neutre o cationiche



Escrezione renale dei farmaci proteici e peptidici

- Il rene è l'organo più importante nell'eliminazione delle molecole proteiche di piccole dimensioni (< 40 - 50 kDa) che vengono ultrafiltrate dal glomerulo



Escrezione renale dei farmaci proteici e peptidici

- riassorbiti dal tubulo prossimale per endocitosi e quindi degradati all'interno della cellula a piccoli peptidi e aminoacidi
- metabolizzati dalle esopeptidasi intraluminali nel tubulo prossimale; i frammenti sono riassorbiti da trasportatori di membrana (PEPT2)
- il metabolismo renale è importante per interleuchine, interferoni, TNF α , CSF
- Nell'urina si rilevano solo piccole quantità di proteina intatta

