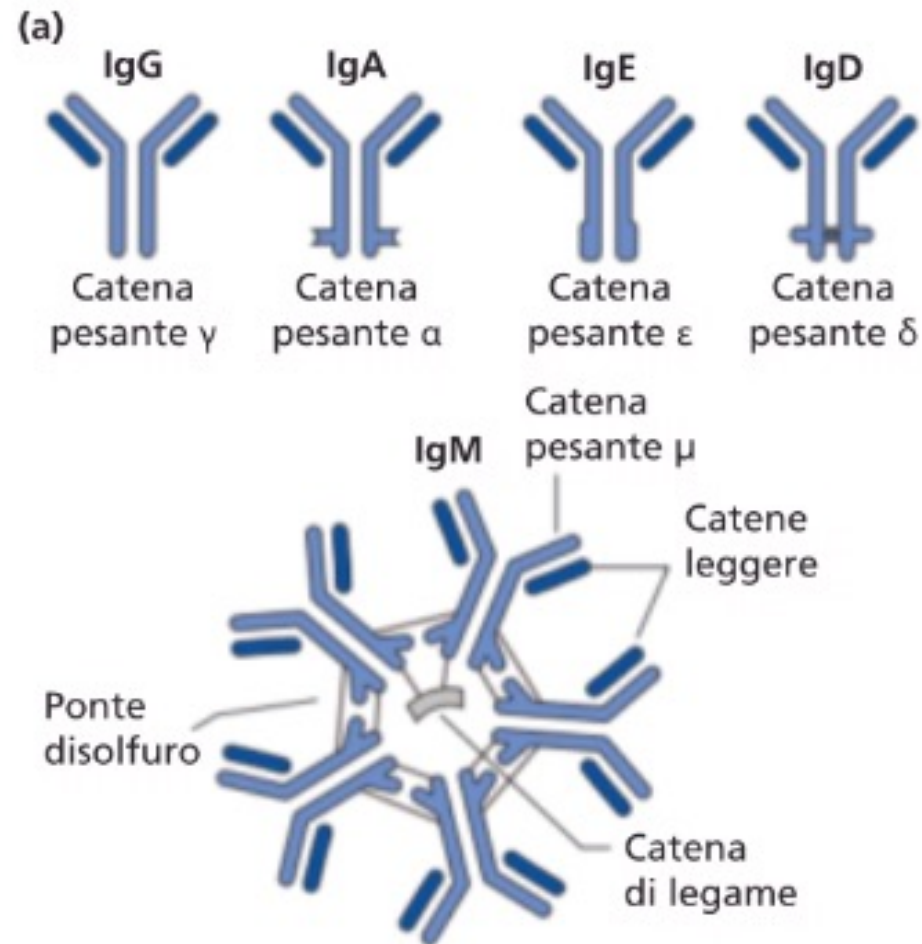
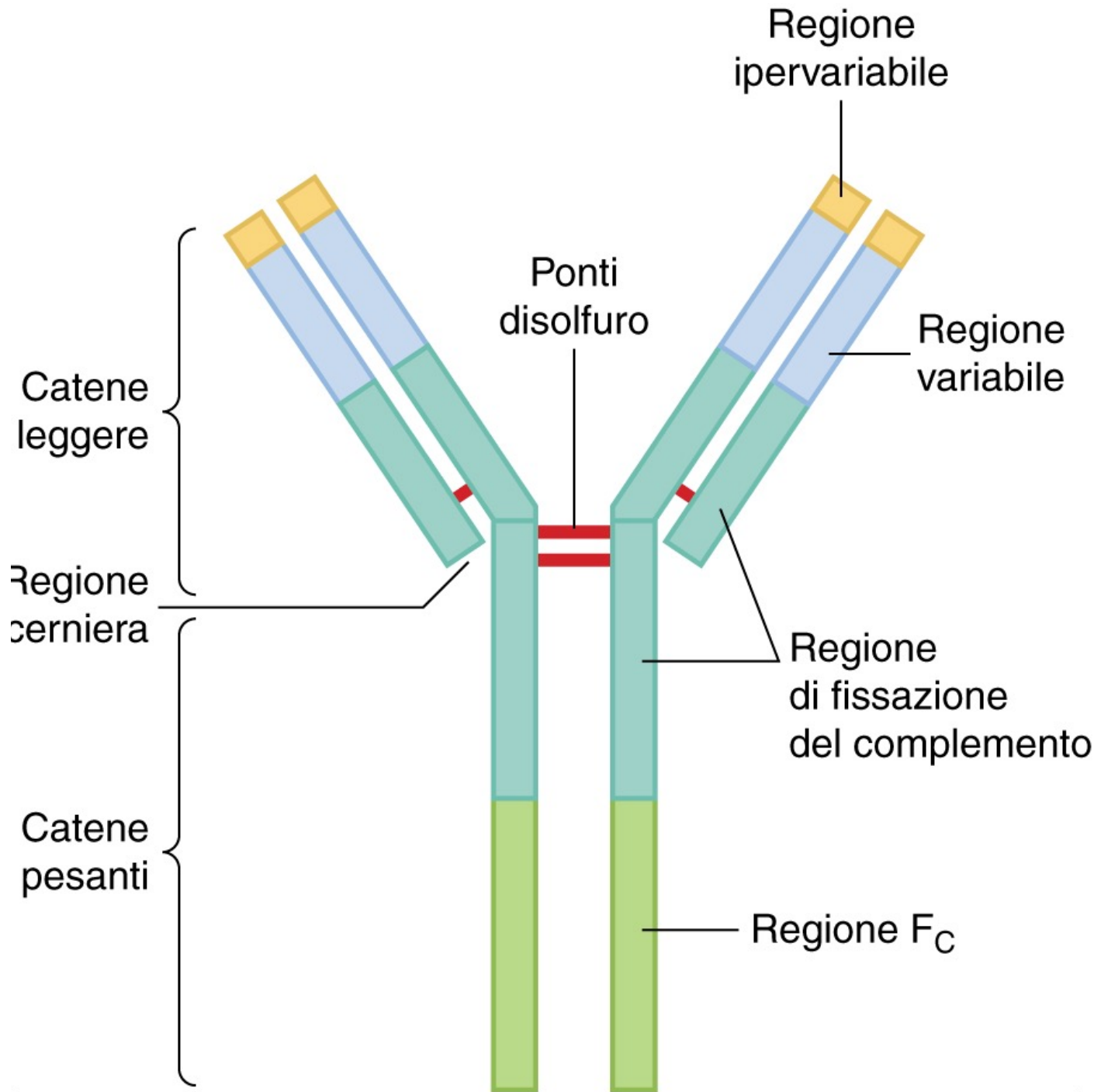


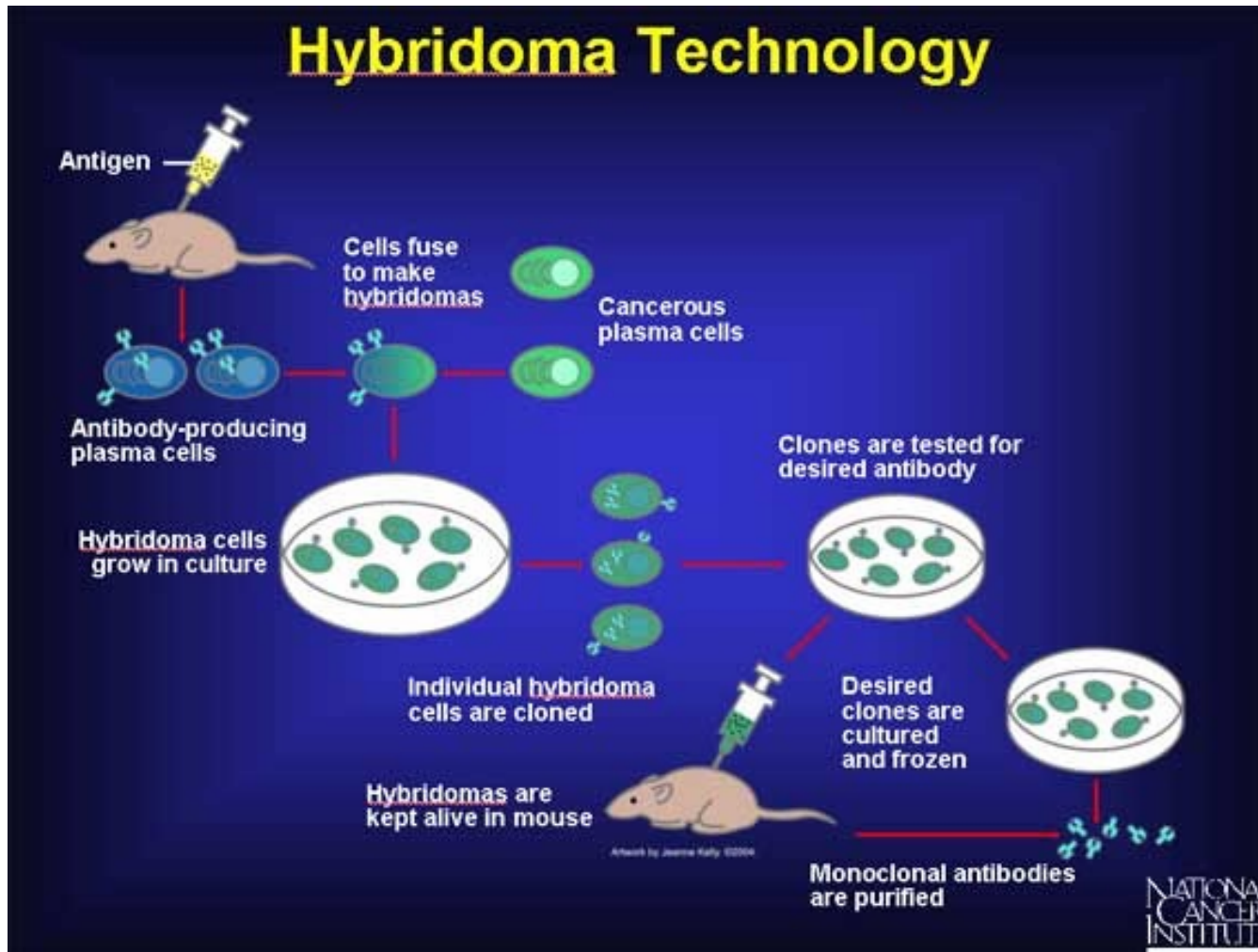
Anticorpi monoclonali



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



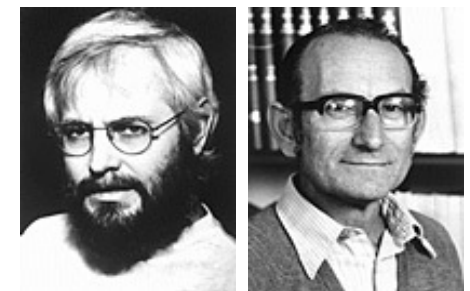
1984 – premio Nobel per la medicina

Kohler & Milstein

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

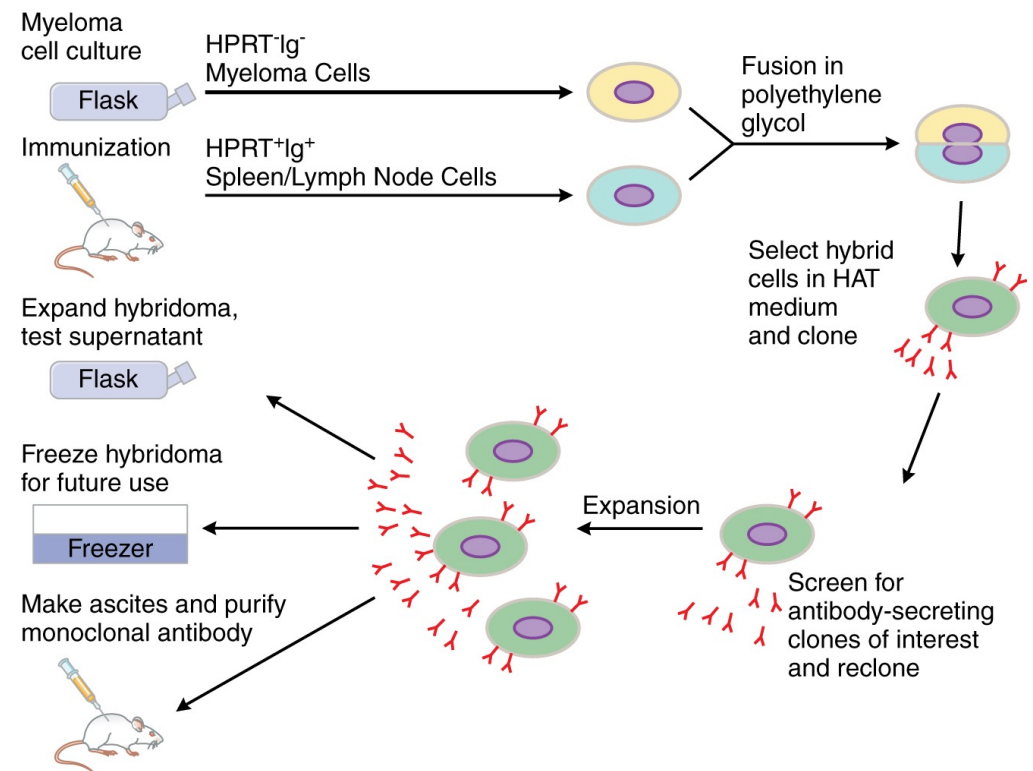
Nature. 1975 Aug 7;256(5517):495-7

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).



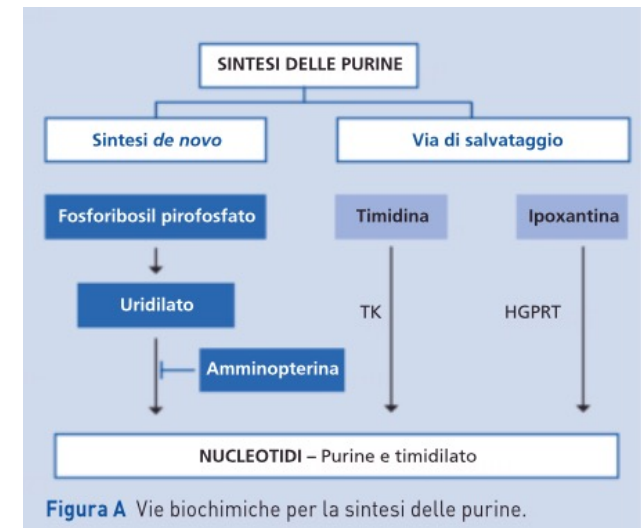
Terreno di cultura HAT (ipoxantina - amminopterina - timidina)

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.

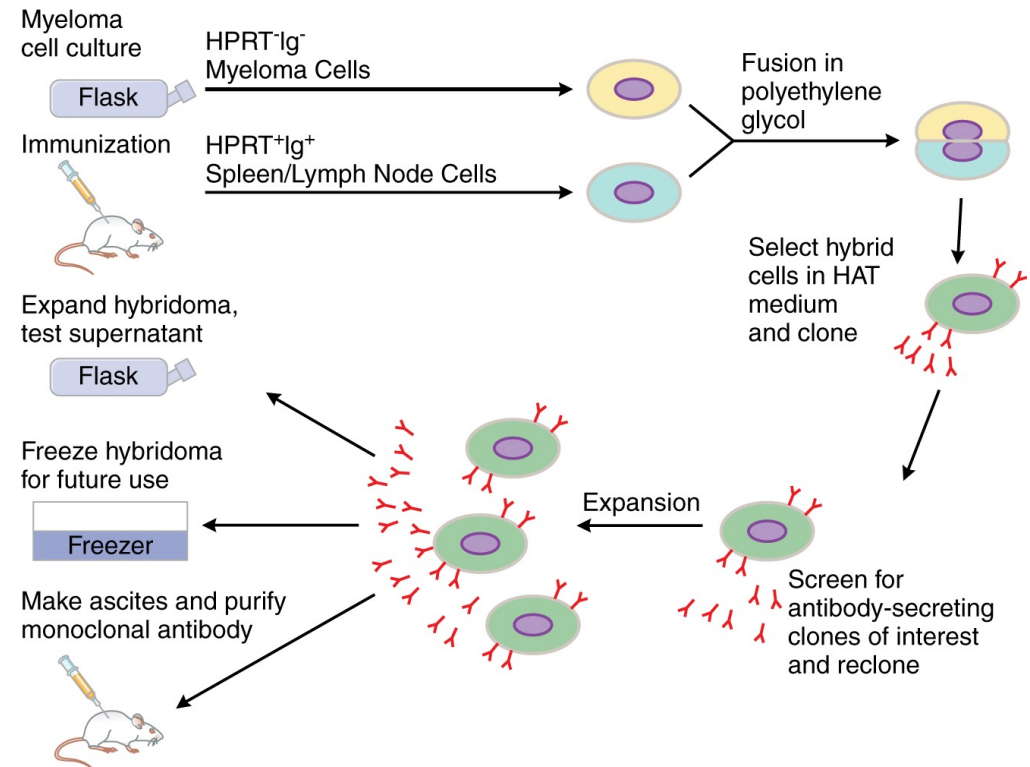
Sopravvivono nel mezzo HAT solo gli **ibridomi** in quanto possono utilizzare l' ipoxantina come sorgente di nucleotidi guaninici (componente dello splenocita) e possono sopravvivere per lungo tempo in coltura (componente del mieloma).



TK: timidina kinasi
HGPRT: ipoxantina guanosina fosforibosil-trasferasi

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).



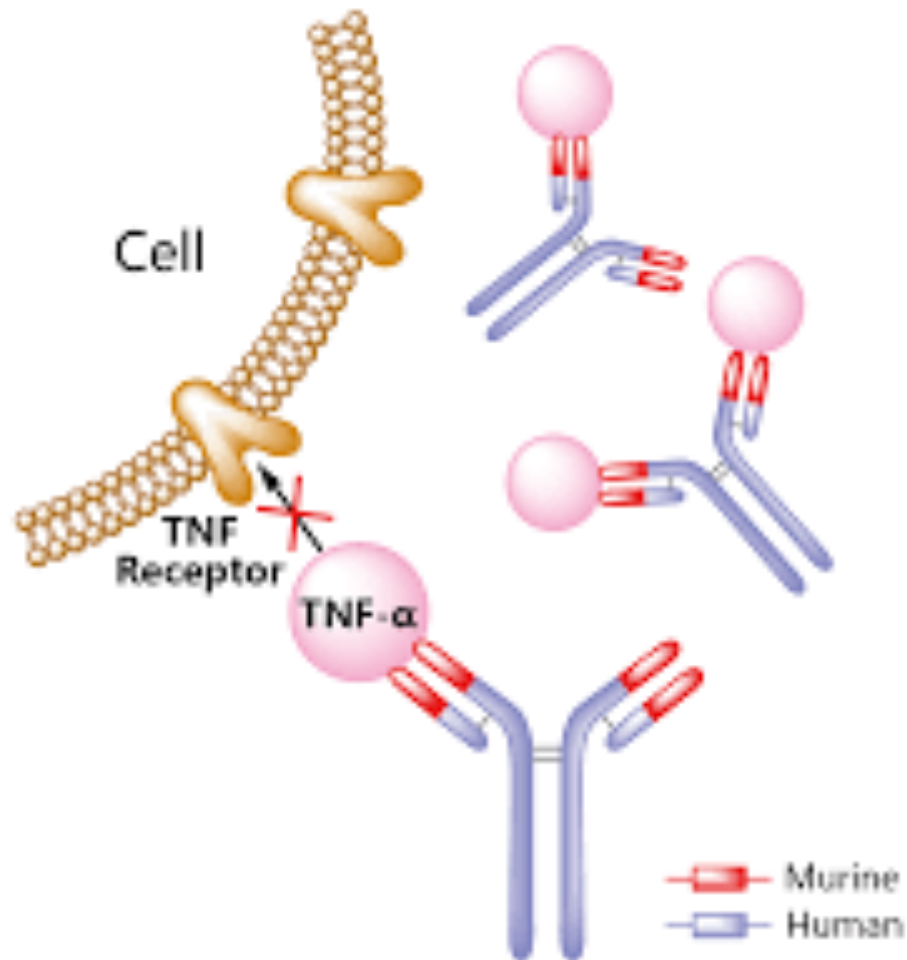
L'HAT medium fa sì che solo le cellule in cui è avvenuta la fusione sopravvivano: il risultato è

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

Anticorpi terapeutici ottenuti con la tecnologia dell'ibridoma

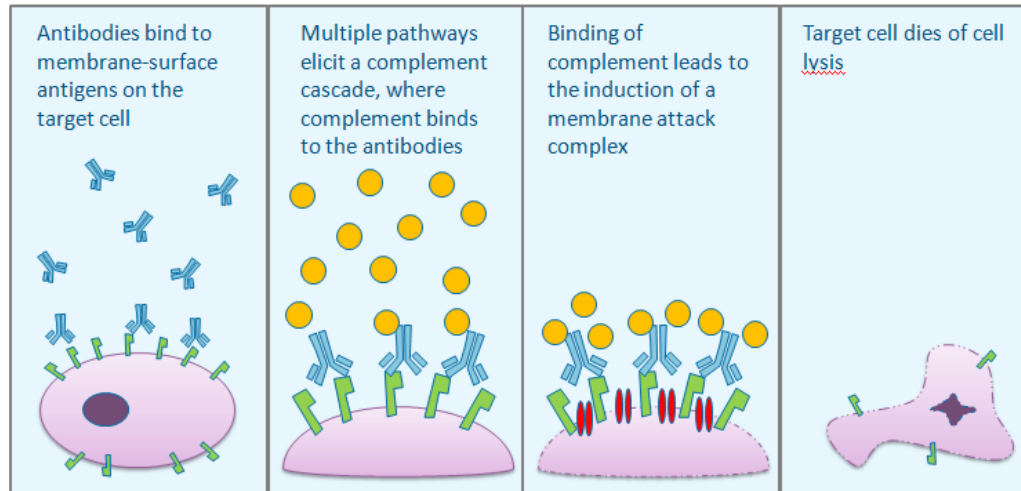
- Ha reso possibile l'ottenimento di grandi quantità di anticorpi specifici per un determinato antigene.
- Storicamente, il primo anticorpo monoclonale il cui uso è stato autorizzato nei pazienti è un anti-CD3 dei linfociti T, **MUROMONAB** o **ortoclone OKT3**, per trattare il rigetto acuto dopo trapianto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

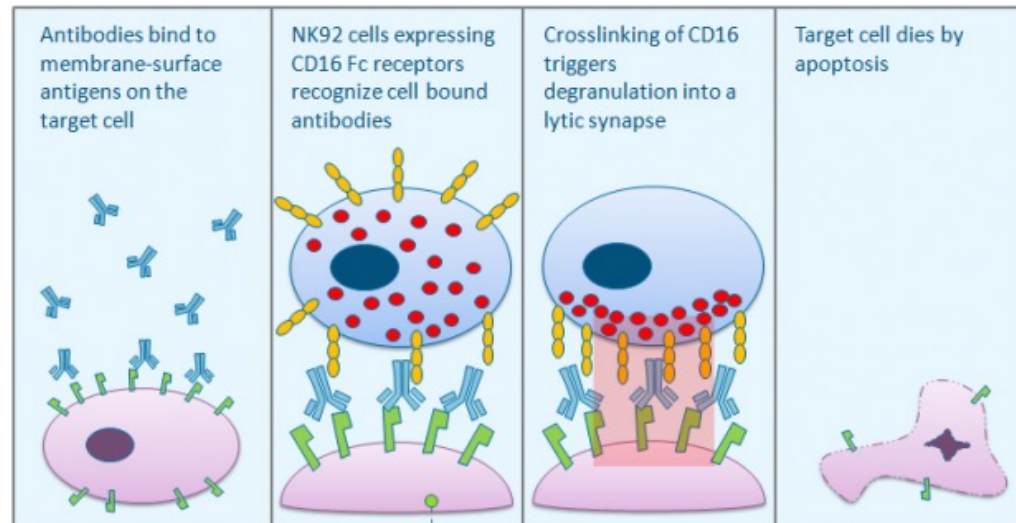


Modulazione diretta
dell'antigene bersaglio =
terapie anti-TNF α o anti-IgE

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.	
<i>Human anti-chimeric antibodies</i>	{ RITUXIMAB	{ LINFOMA	25%
		{ CANCRO SENO	0.1
<i>Human anti-human antibodies</i>	{ TRASTUZUMAB		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.

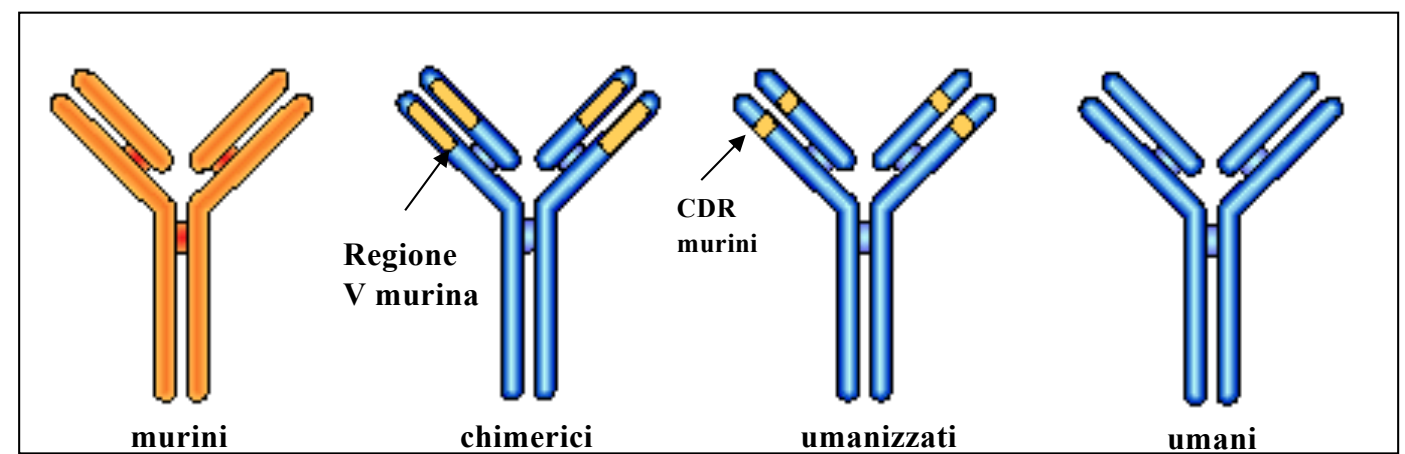
(da "Pharmaceutical Biotechnology" - 2008)

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.

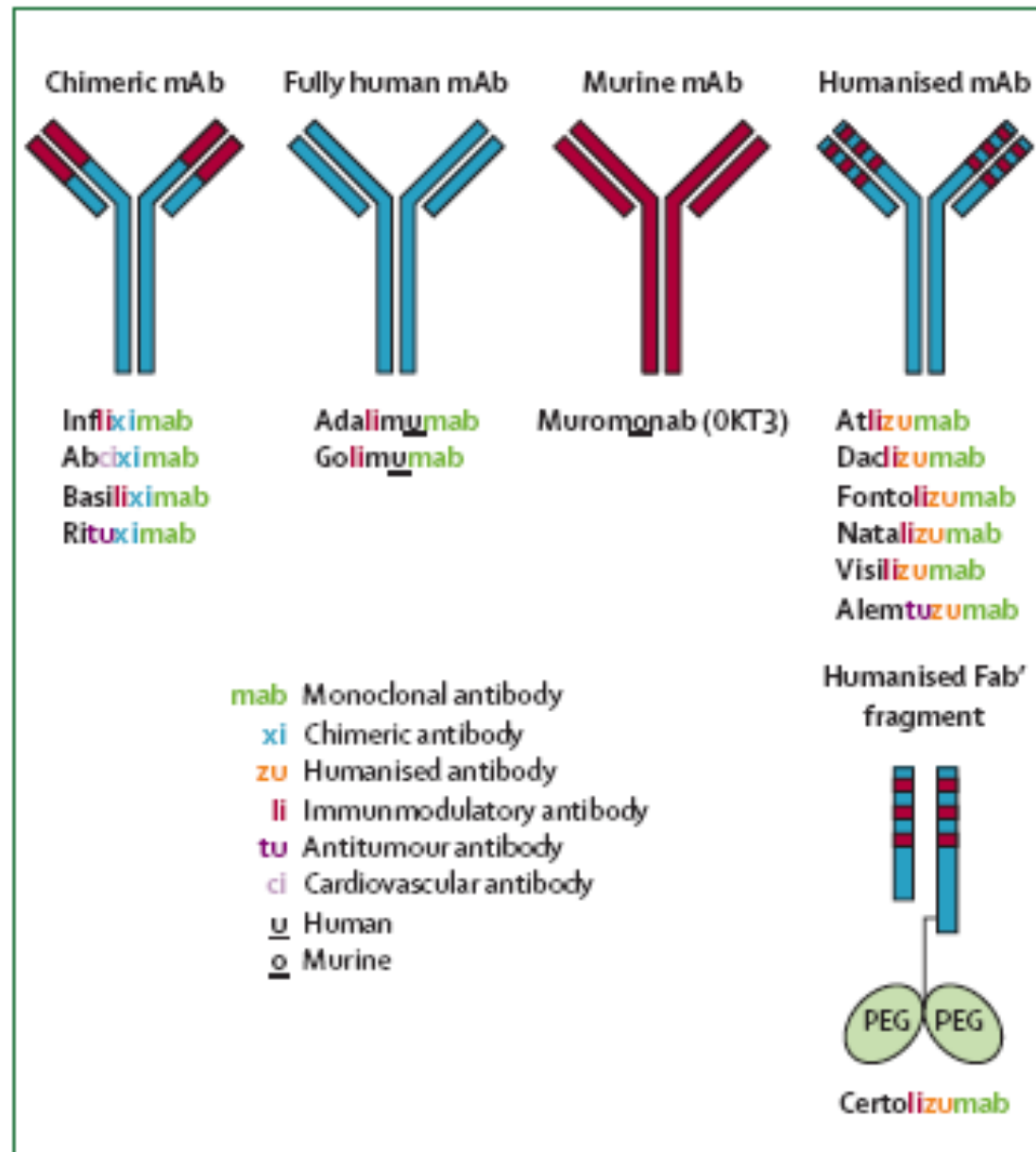
Negli ultimi 30 anni diversi approcci sono stati ideati in modo da "umanizzare" gli anticorpi murini.

- 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

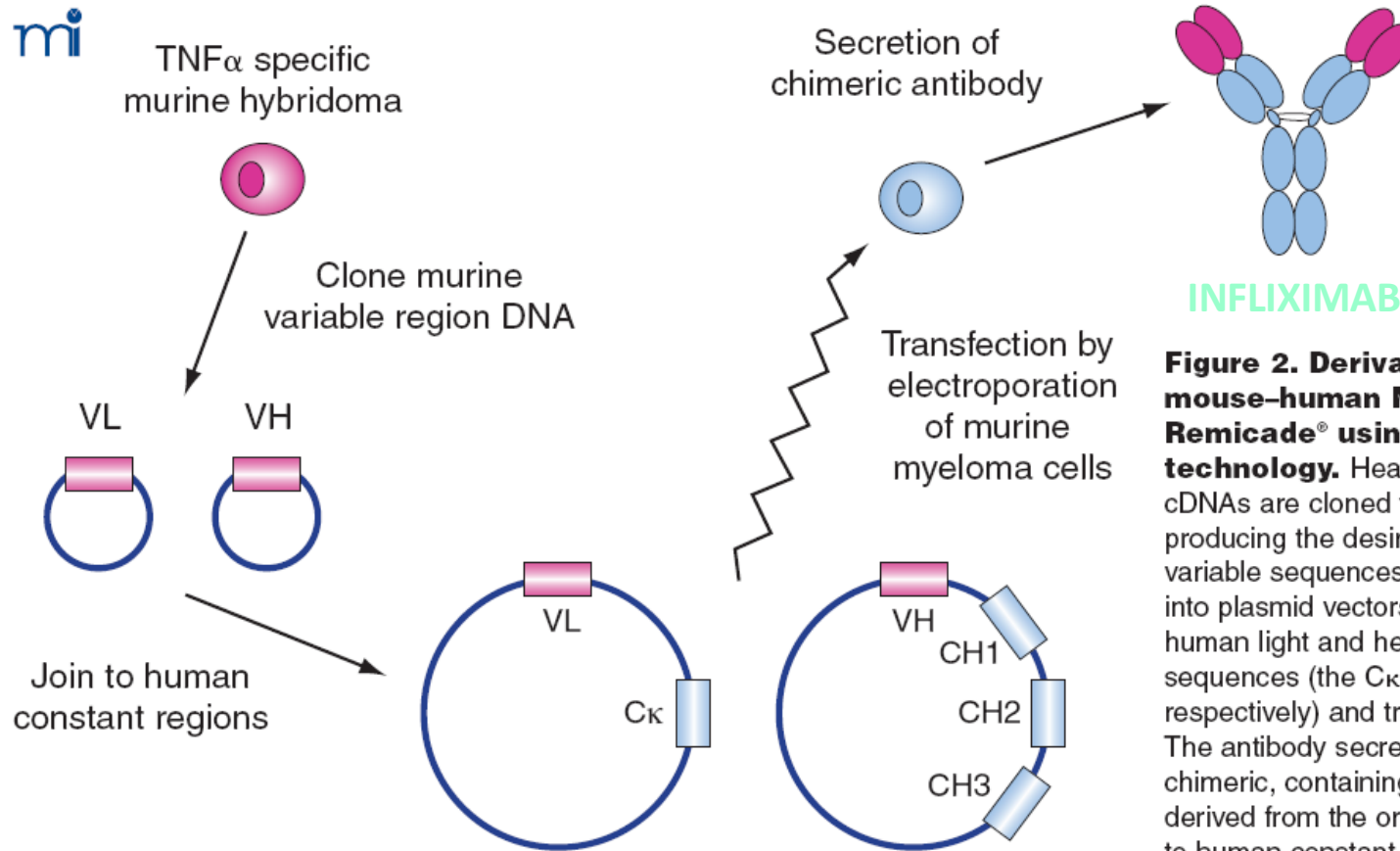


Figure 2. Derivation of chimeric mouse-human MABs such as Remicade[®] using recombinant DNA technology. Heavy and light chain variable cDNAs are cloned from a hybridoma cell clone producing the desired mouse MAb. These variable sequences (VL and VH) are inserted into plasmid vectors containing the desired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

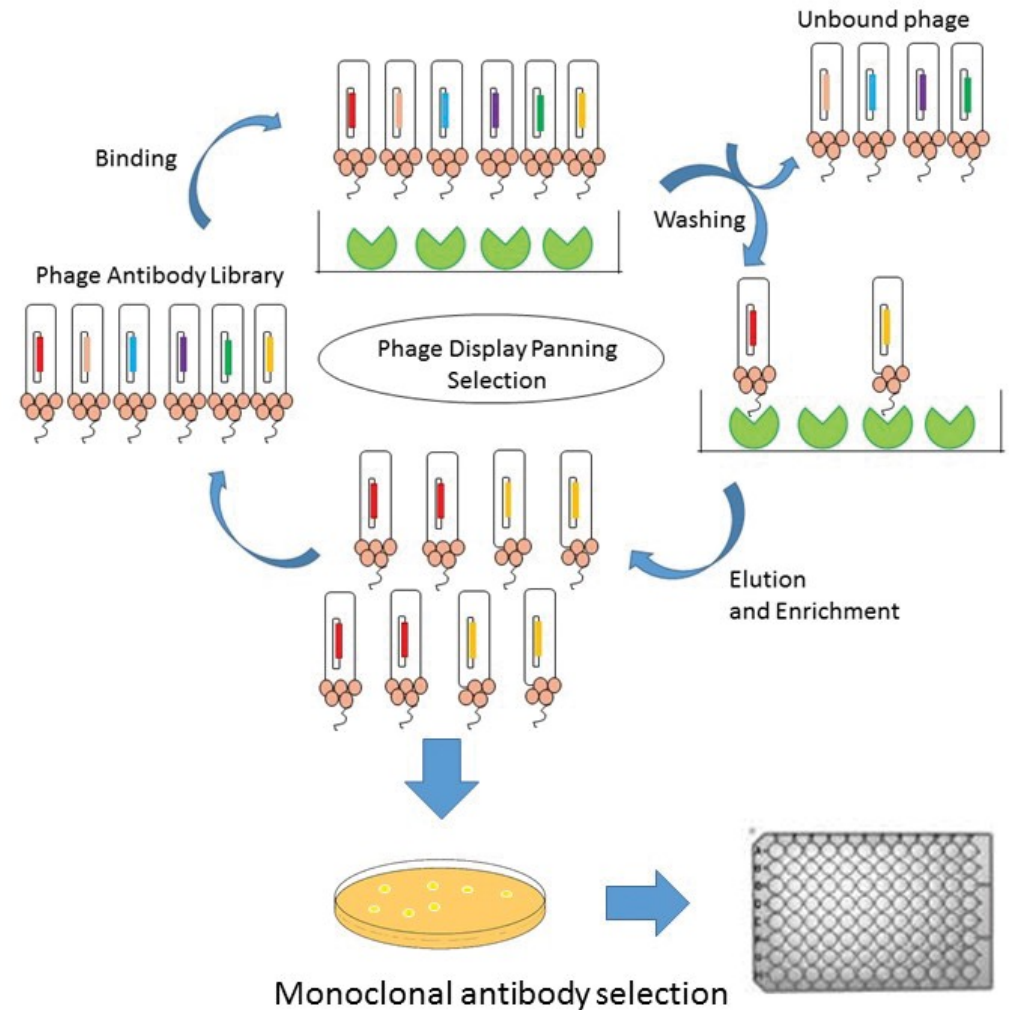
Possono essere prodotti impiegando due approcci:

- 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".



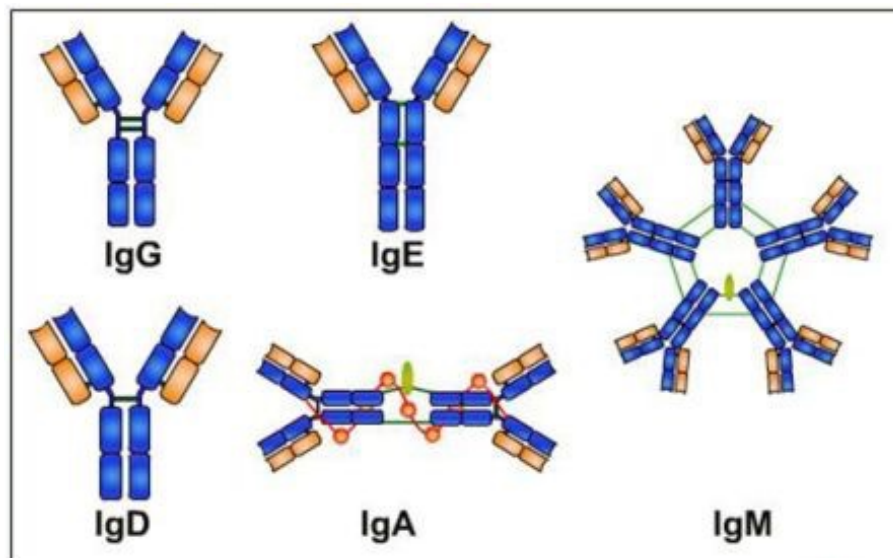
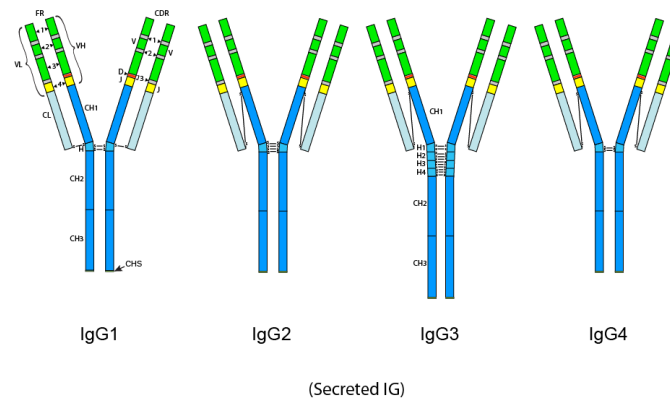


Tabella 10.1 Caratteristiche delle diverse classi di anticorpi.

	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

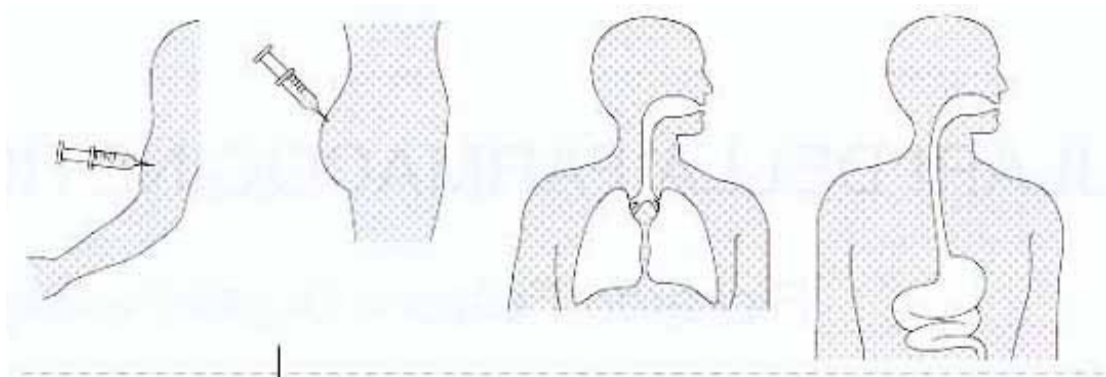


IgG subclass	Percentage in serum	Half life (days)	Binding affinity for FcγRIIa	Complement activation
IgG1	66	~21	+++	++
IgG2	23	~21	+/-	+
IgG3	7	~7	+++	+++
IgG4	4	~21	+ to -	-

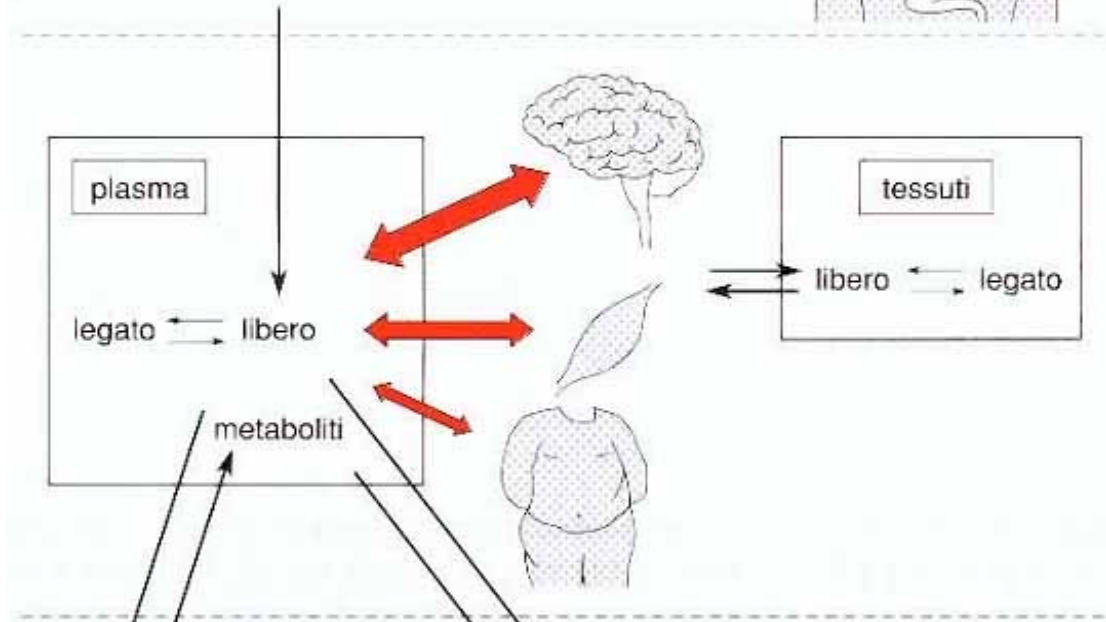
IgG1: la sottoclasse più utilizzata, soprattutto quando si vuole una citotossicità cellulo mediata (oncologia)
 IgG2 e IgG4, non mediano la citotossicità, vengono scelti quando si vuole evitare la morte cellulare.

Farmacocinetica

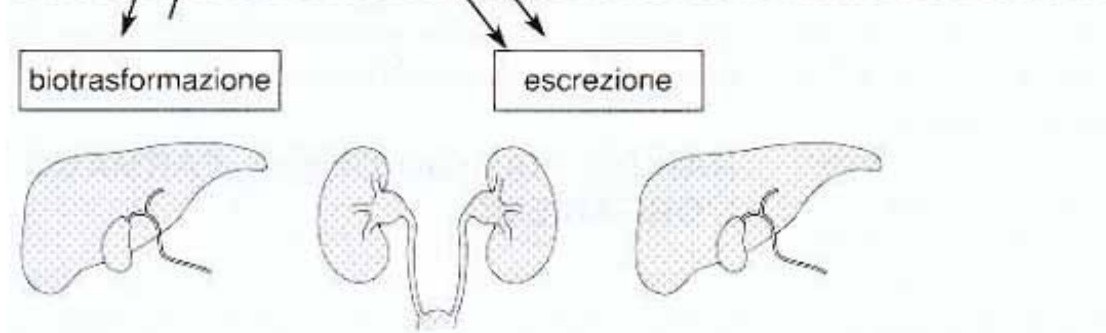
assorbimento



distribuzione



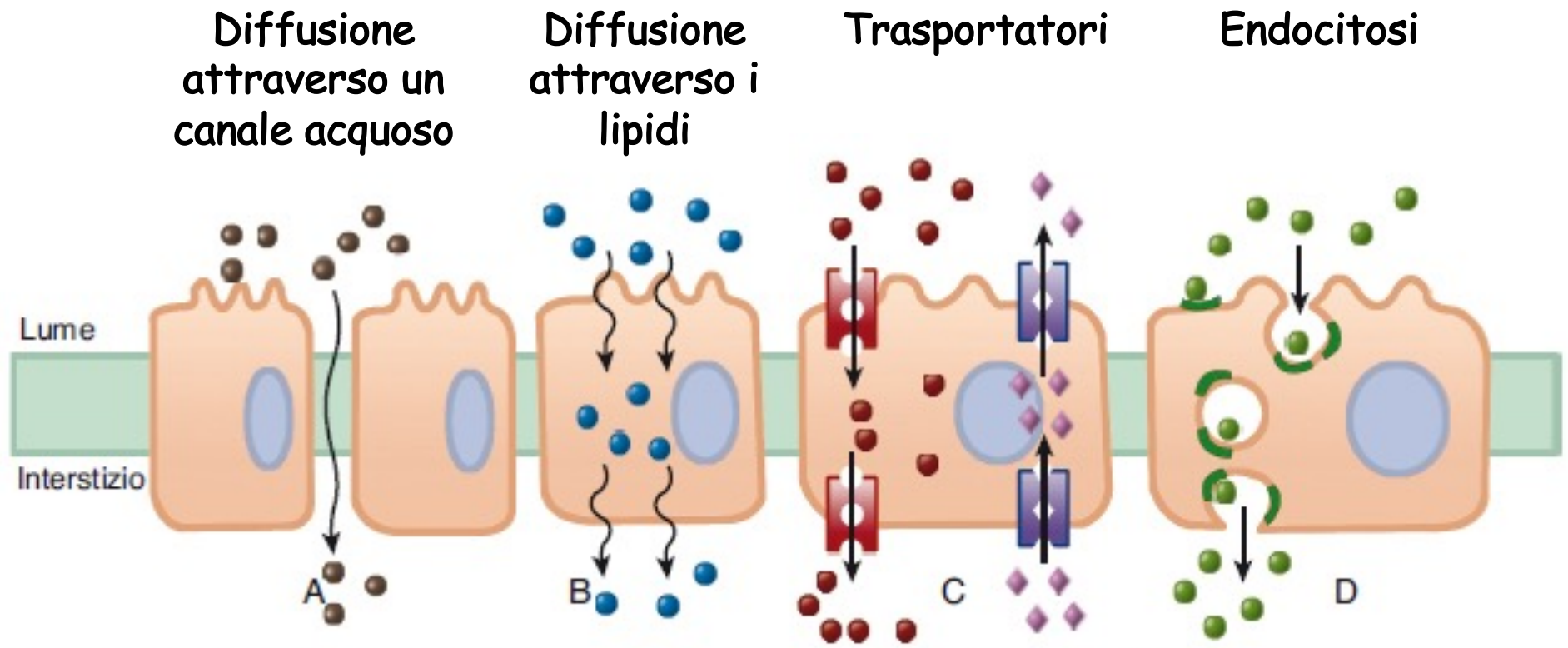
eliminazione



La complessità delle proteine

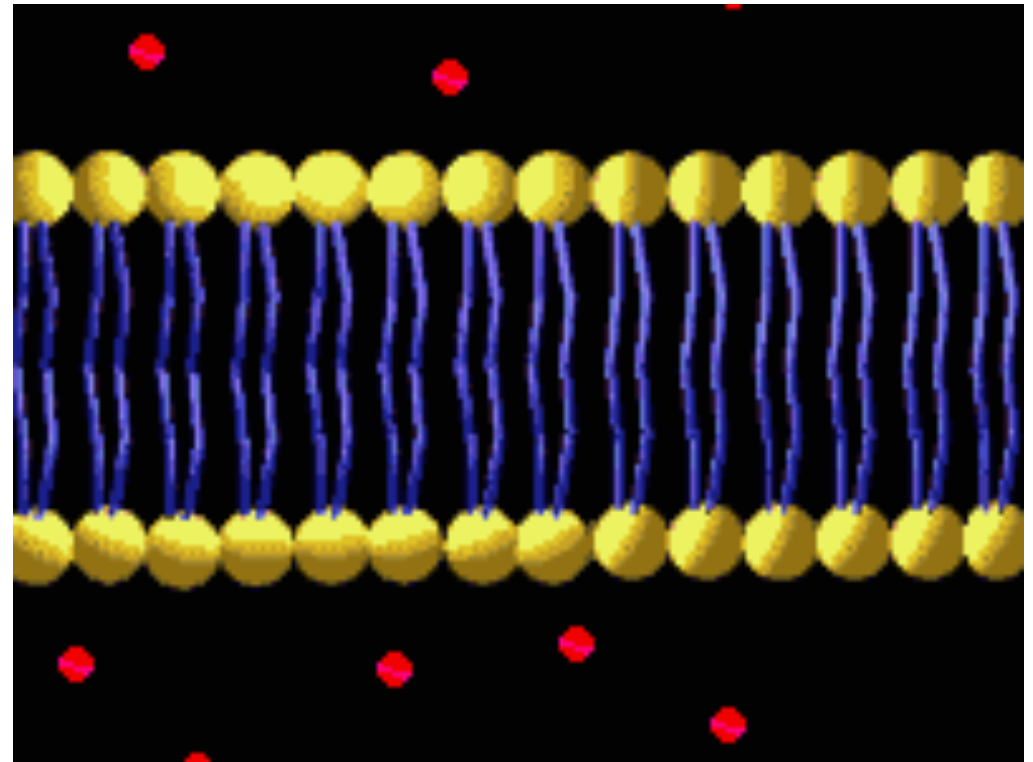
- Strutture molto **grandi e instabili**
- Struttura che si mantiene conformata con **forze di legame molto deboli**
- **Facile denaturazione** anche in condizioni non aggressive
- **Facilmente eliminate e distrutte dall'organismo**

Passaggio dei farmaci attraverso le membrane cellulari



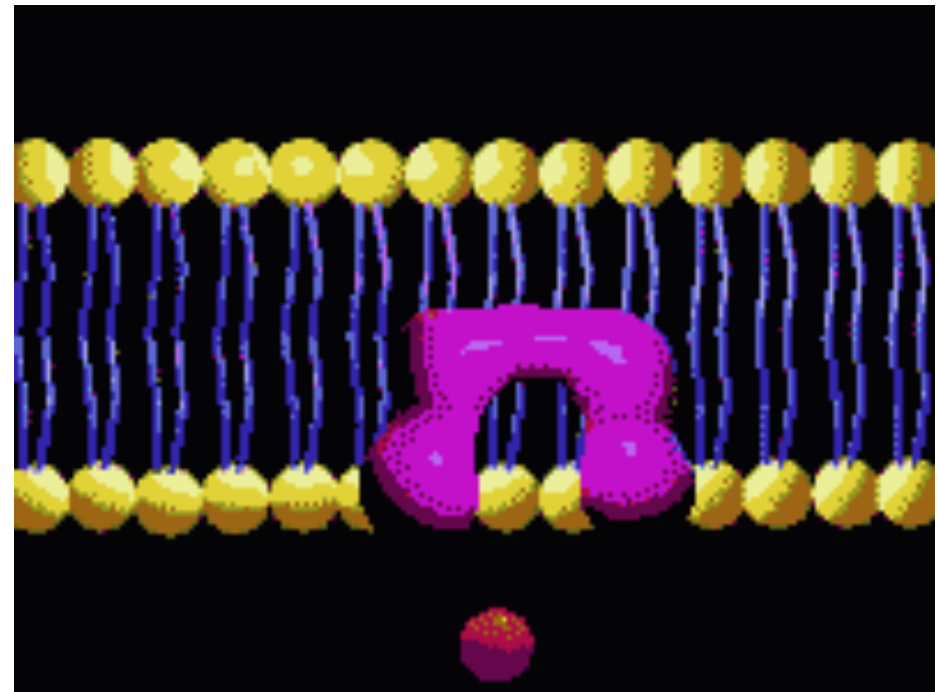
Diffusione semplice

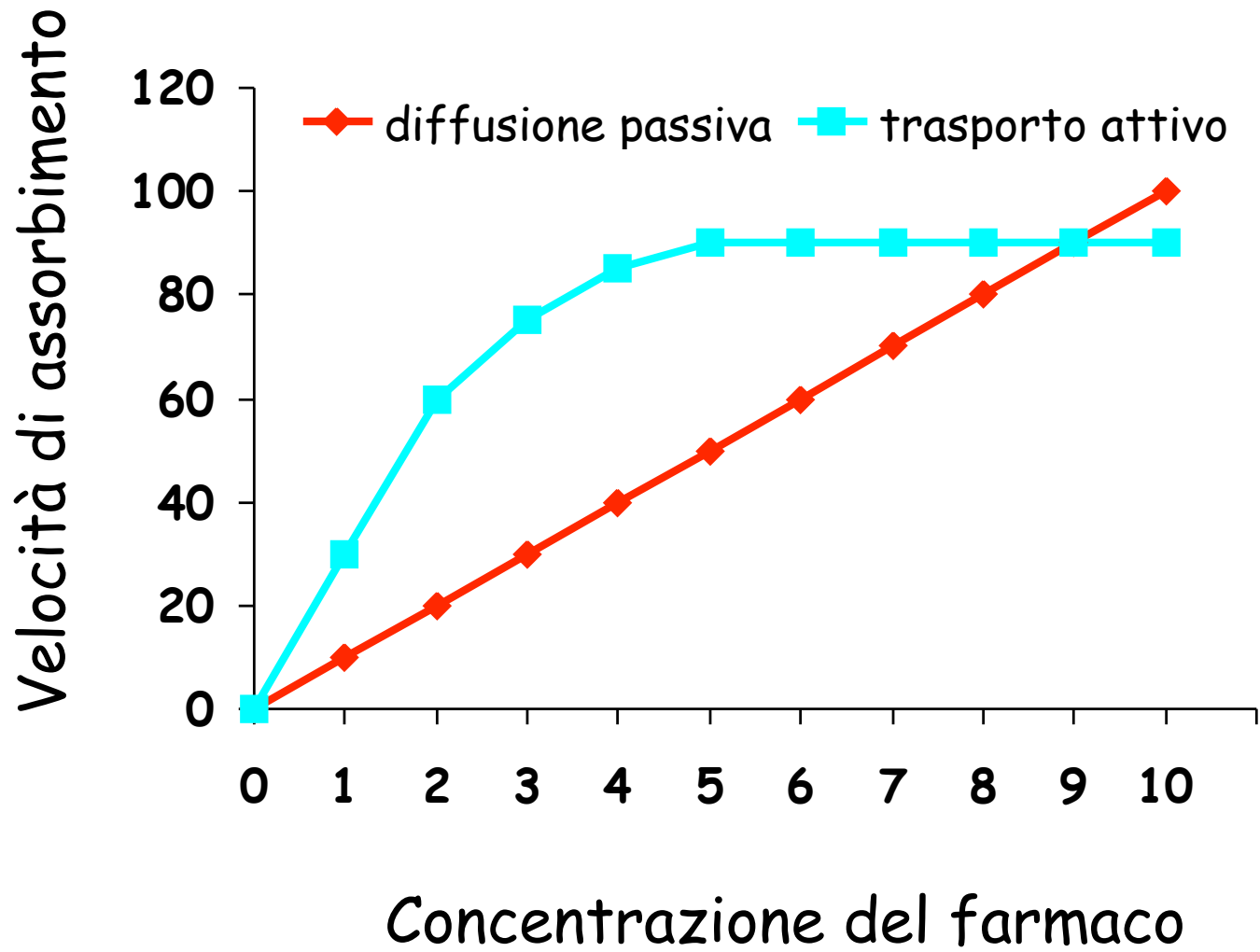
- È la modalità più frequente di passaggio dei farmaci attraverso le membrane
- non richiede consumo di energia
- non è selettiva
- è tanto più rapida e completa quanto più il farmaco è liposolubile



Trasporto attivo

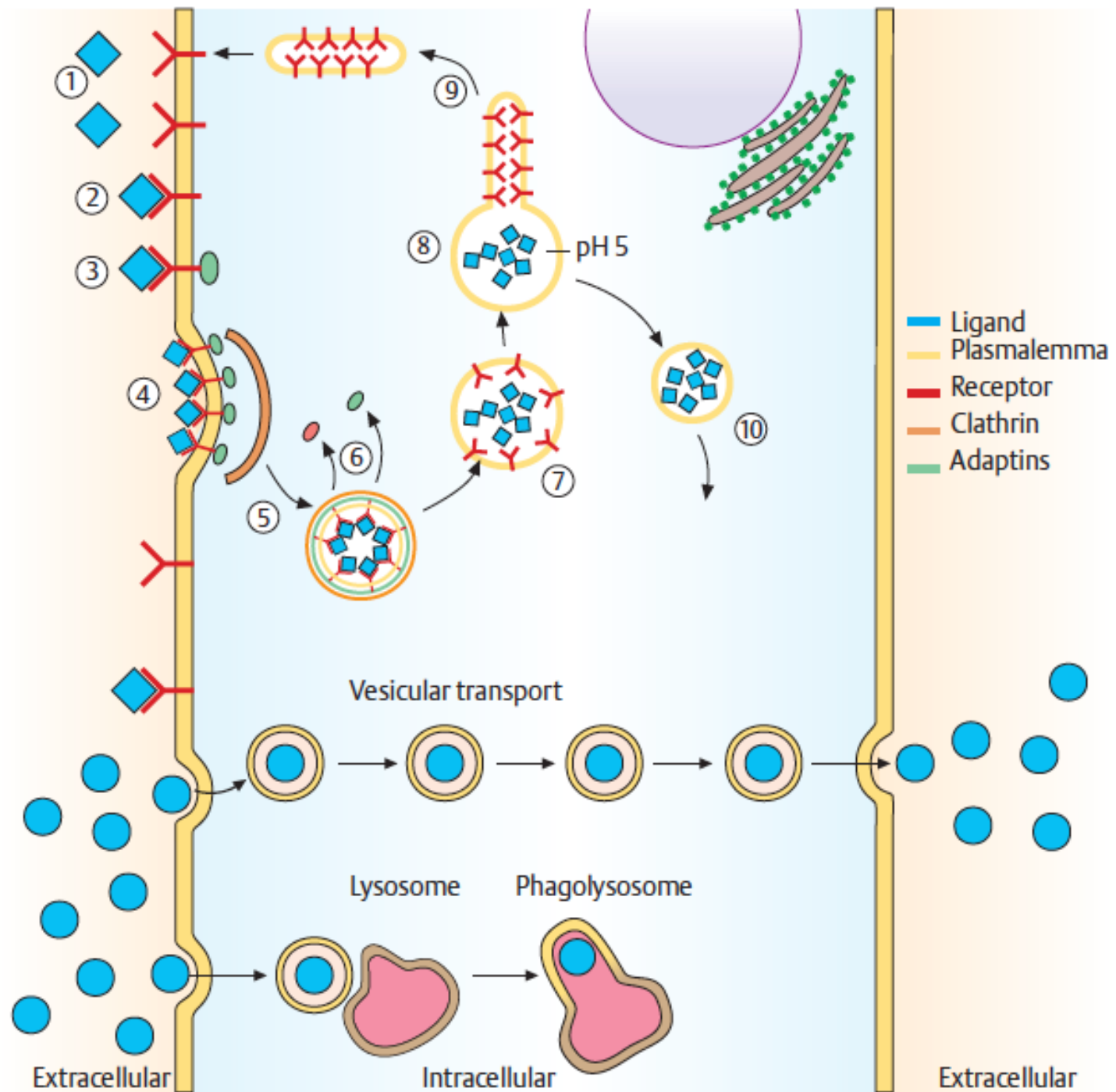
- È mediato da un carrier
- trasporta farmaci che sono analoghi di sostanze endogene (5-fluorouracile, l-dopa)
- trasporta contro gradiente e consuma energia
- è altamente selettivo ma molecole simili possono competere
- è saturabile

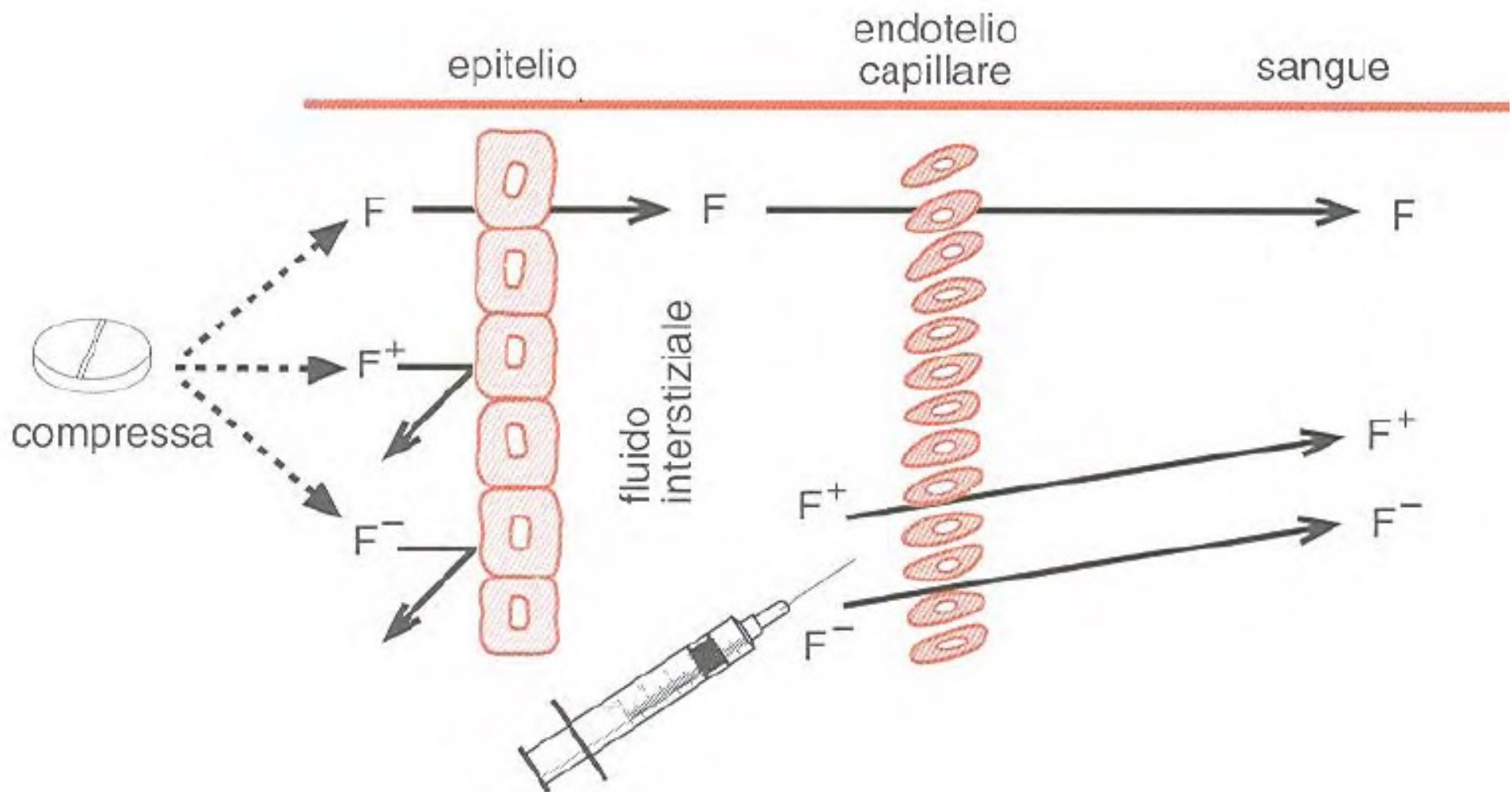




Endocitosi

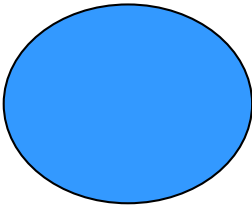
- Processo per cui porzioni di membrana cellulare, introflettendosi e chiudendosi su se stesse, si trasformano in vescicole intracellulari nelle quali rimangono intrappolati:
 1. Componenti della membrana stessa
 2. Sostanze dissolte nei fluidi extracellulari (fluid phase endocytosis)
 3. Sostanze legate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





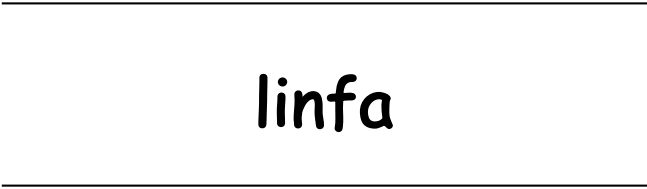


Farmaci a basso PM



Sito di iniezione

Farmaci ad alto PM



linfa

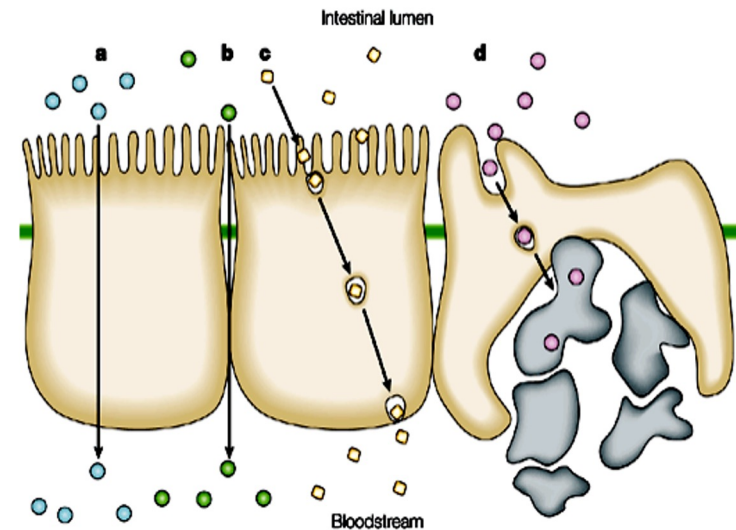
Farmacocinetica dei farmaci proteici e peptidici: **assorbimento**

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

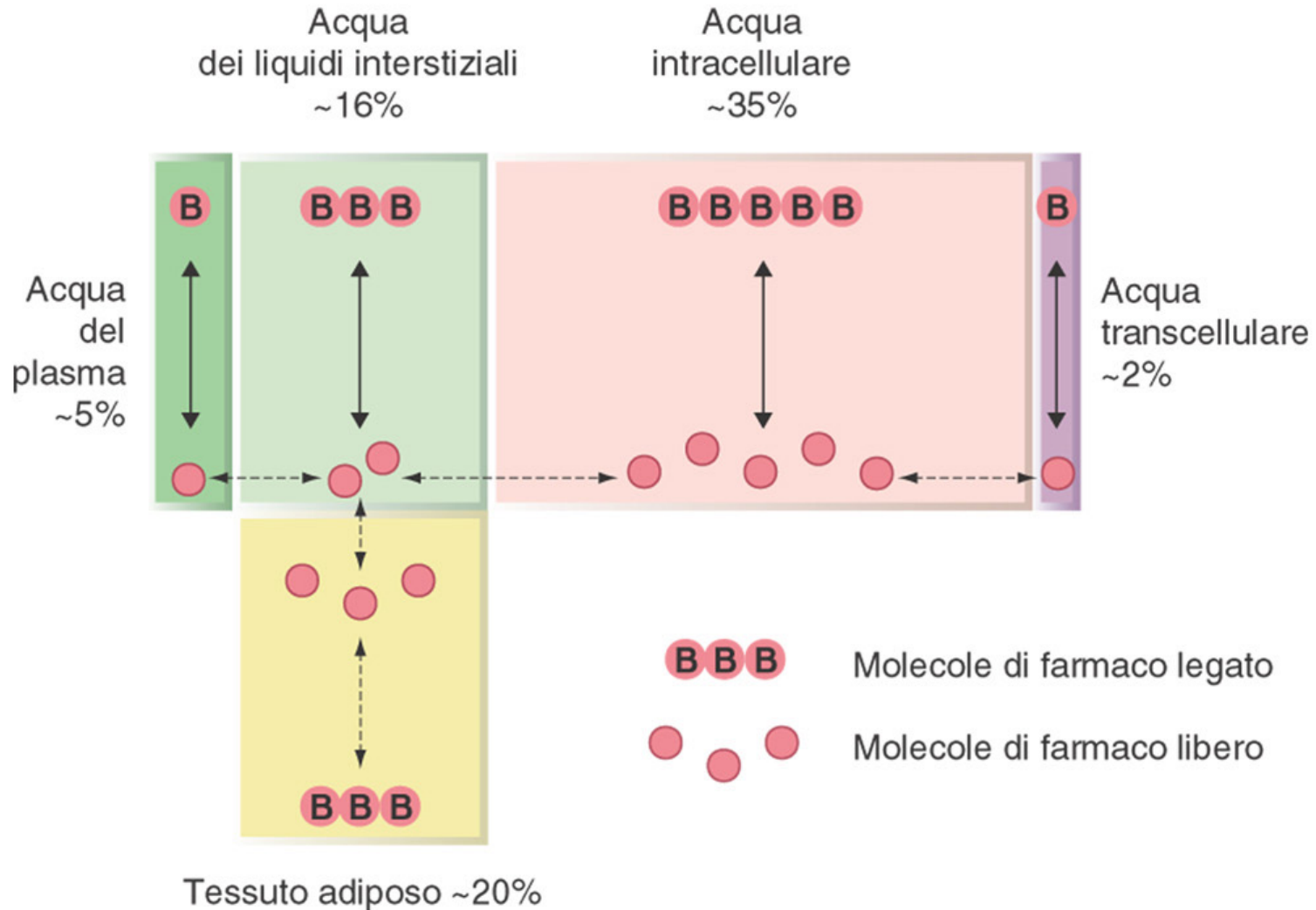
- Endovenosa (infliximab Remicade®...)
- Intramuscolare
- Sottocutanea (anakinra Kineret®, etanercept Enbrel®, adalimumab Humira®, insuline...)
- Intravitreale (ranibizumab Lucentis®, bevacizumab Avastin)

- 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

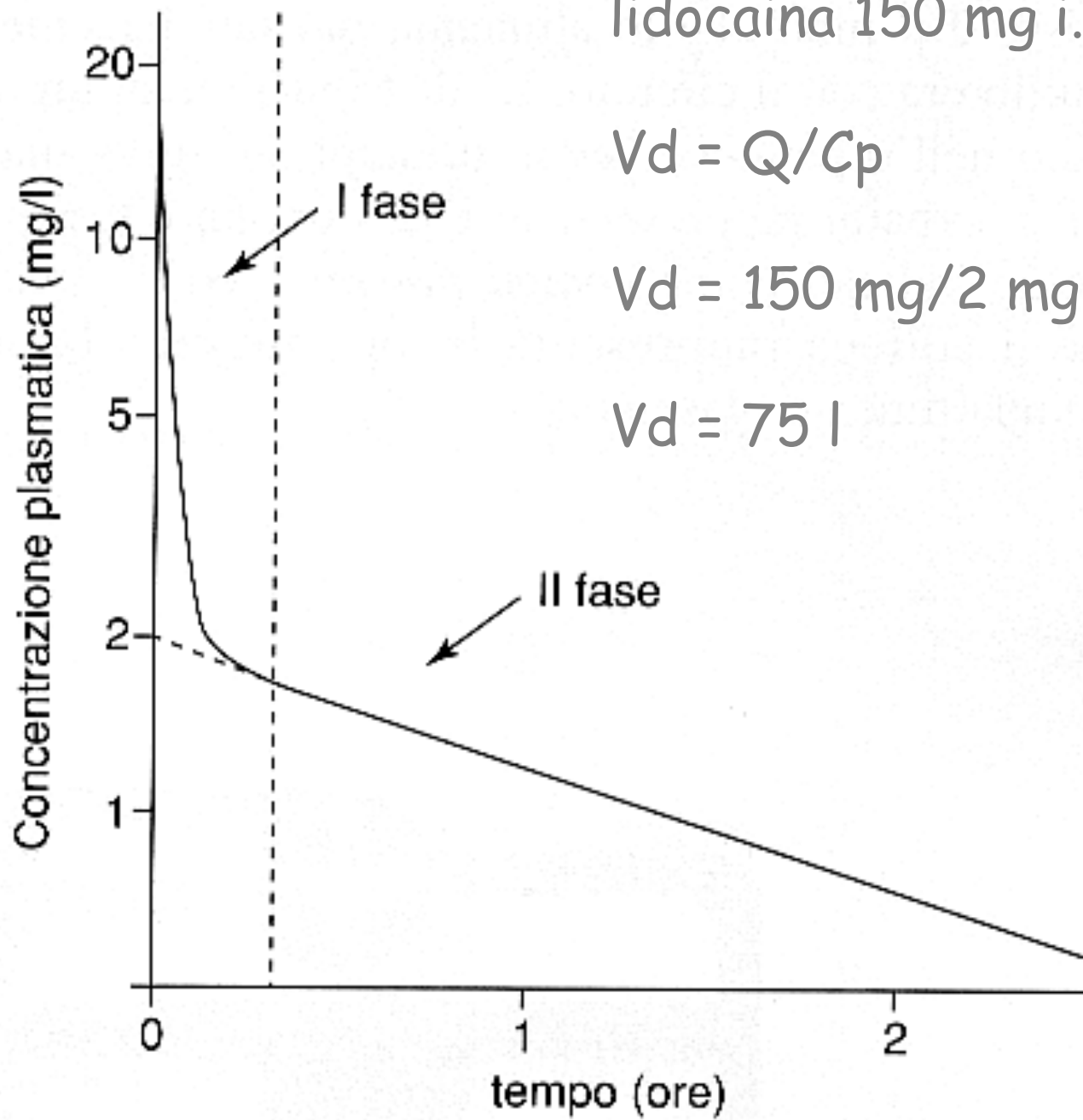
DISTRIBUZIONE DEI FARMACI



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.

$$V_d = Q/C_p$$

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

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

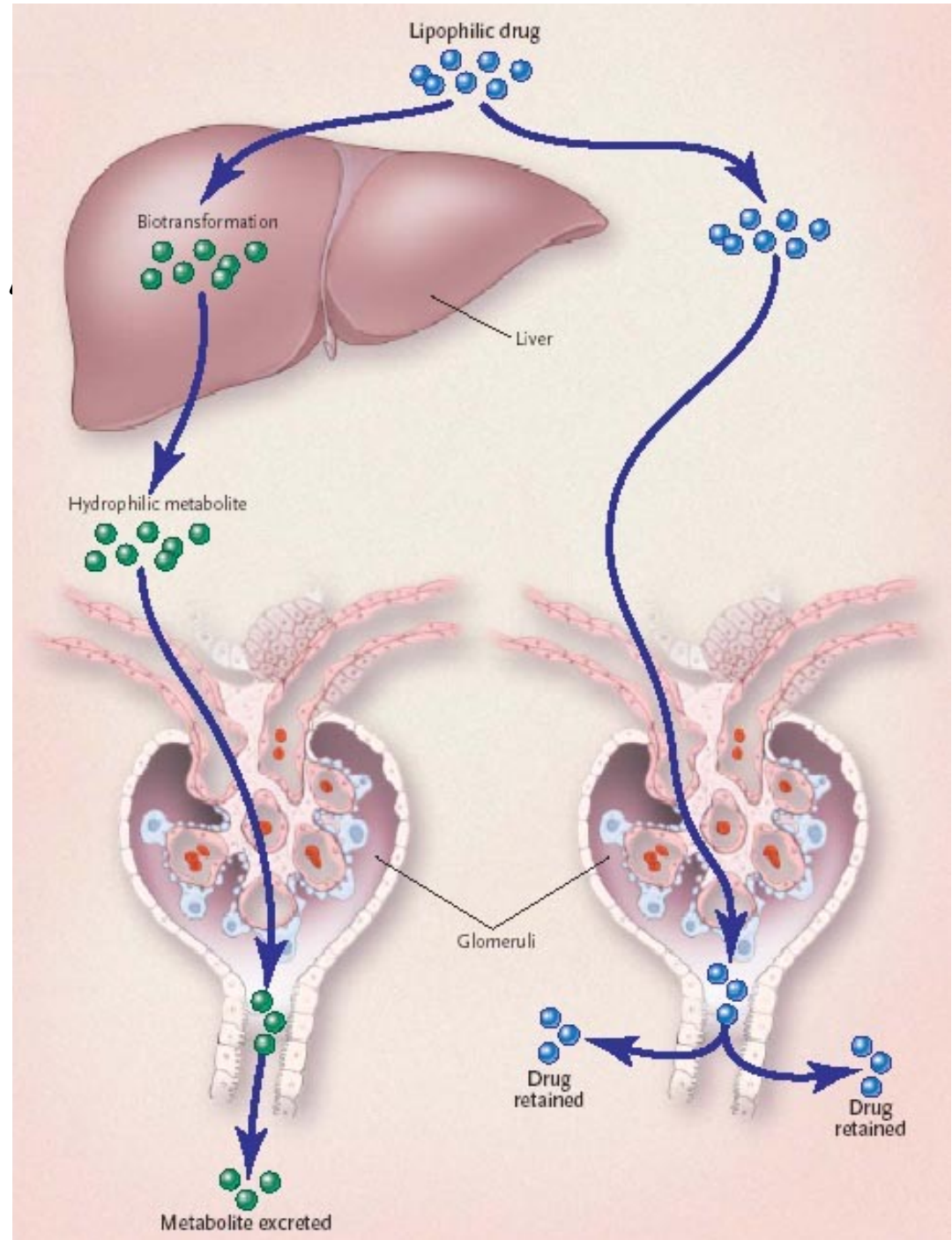
Distribuzione dei farmaci proteici e peptidici

- Il volume di distribuzione apparente è di solito relativamente piccolo
- Per i farmaci biologici 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

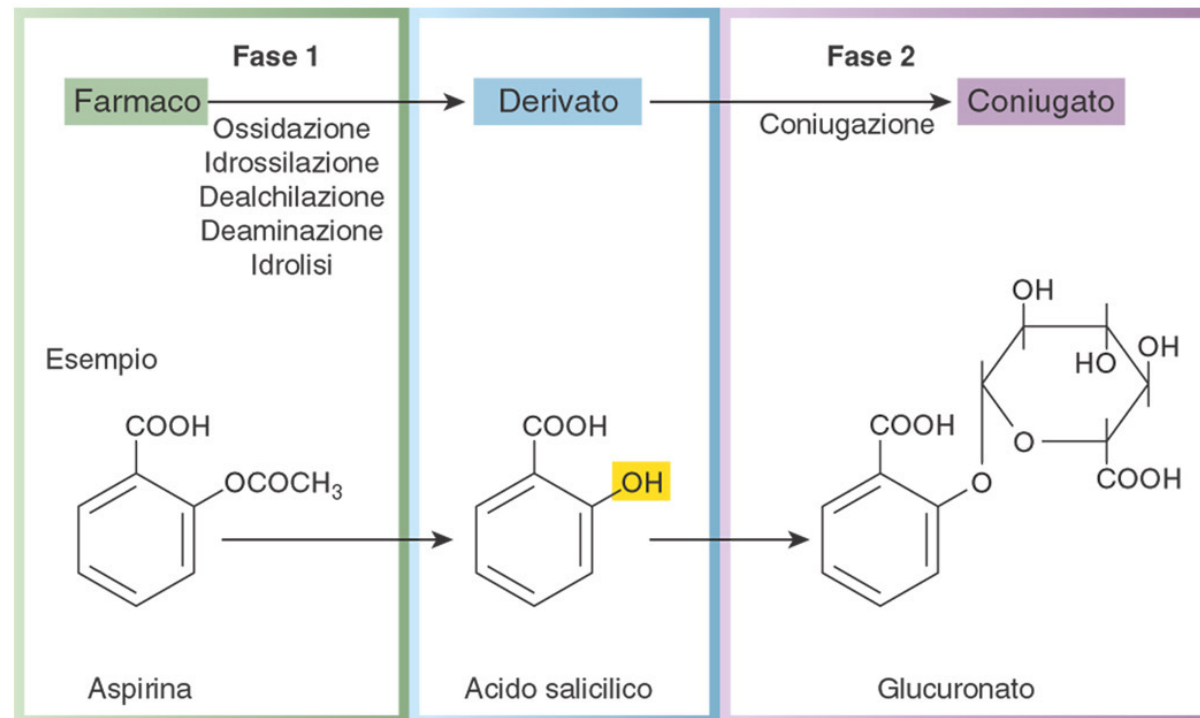
Biotrasformazione

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

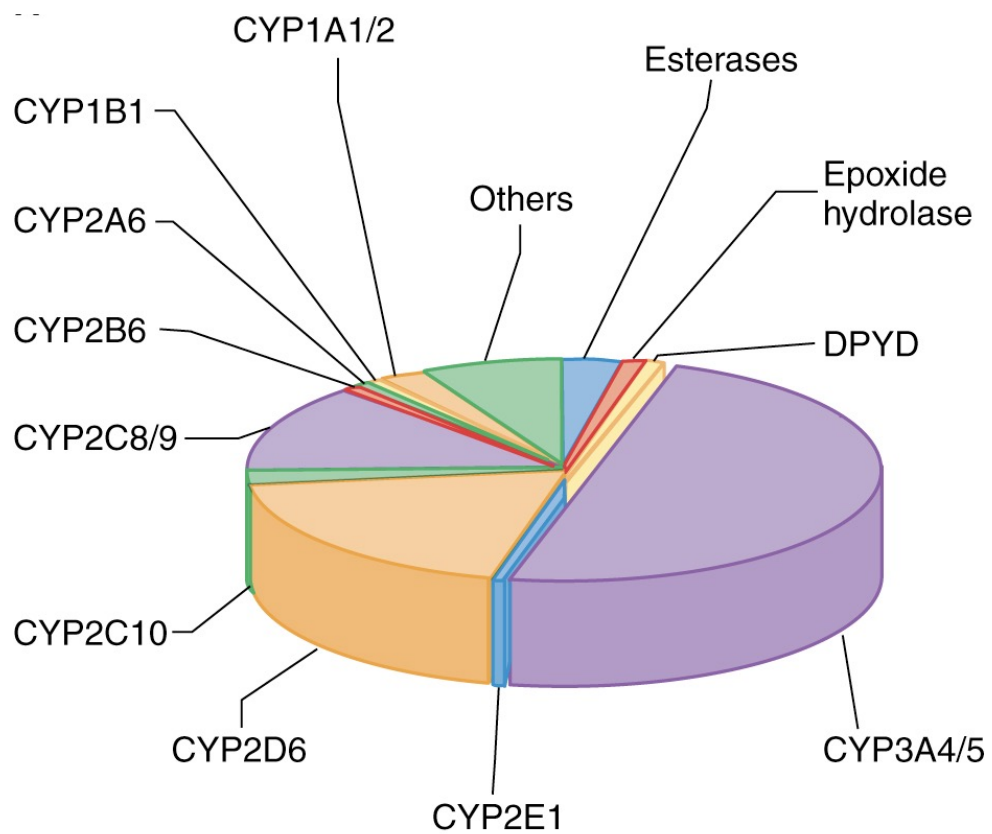


Metabolismo dei farmaci

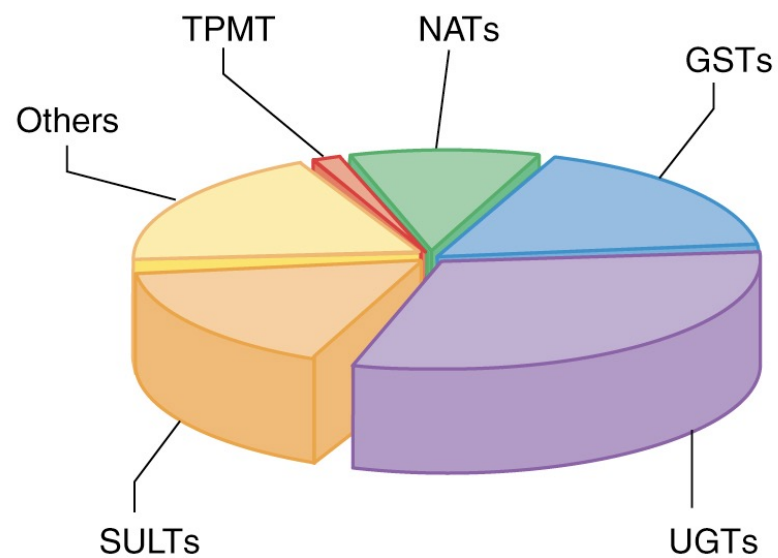
- **Reazioni di fase I o di funzionalizzazione:** hanno la finalità di inserire o mettere in evidenza gruppi funzionali di legame (-OH, -SH, -NH₂, -COOH) per le reazioni di coniugazione. Dal punto di vista chimico sono prevalentemente reazioni di ossidazione, riduzione, idrolisi
- **Reazioni di fase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

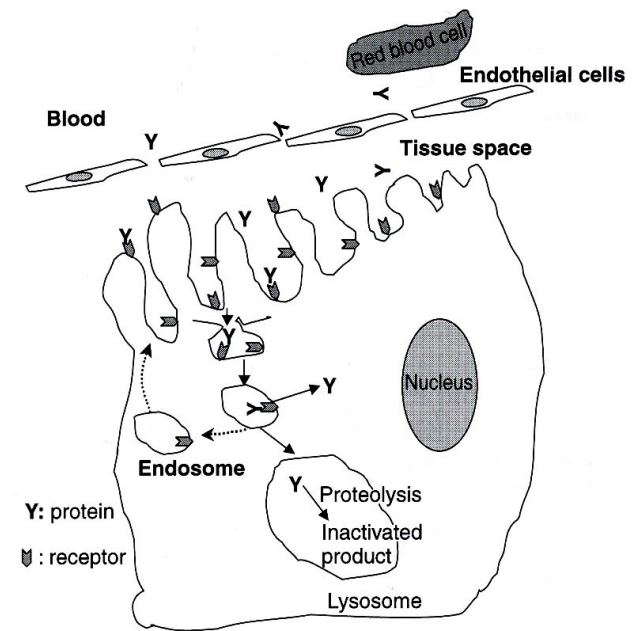
Note: Other determining factors are size, charge, lipophilicity, functional groups, sugar recognition, vulnerability for proteases, aggregation to particles, formation of complexes with opsonization factors, etc. Mechanisms may overlap and endocytosis may occur at any molecular weight range.

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

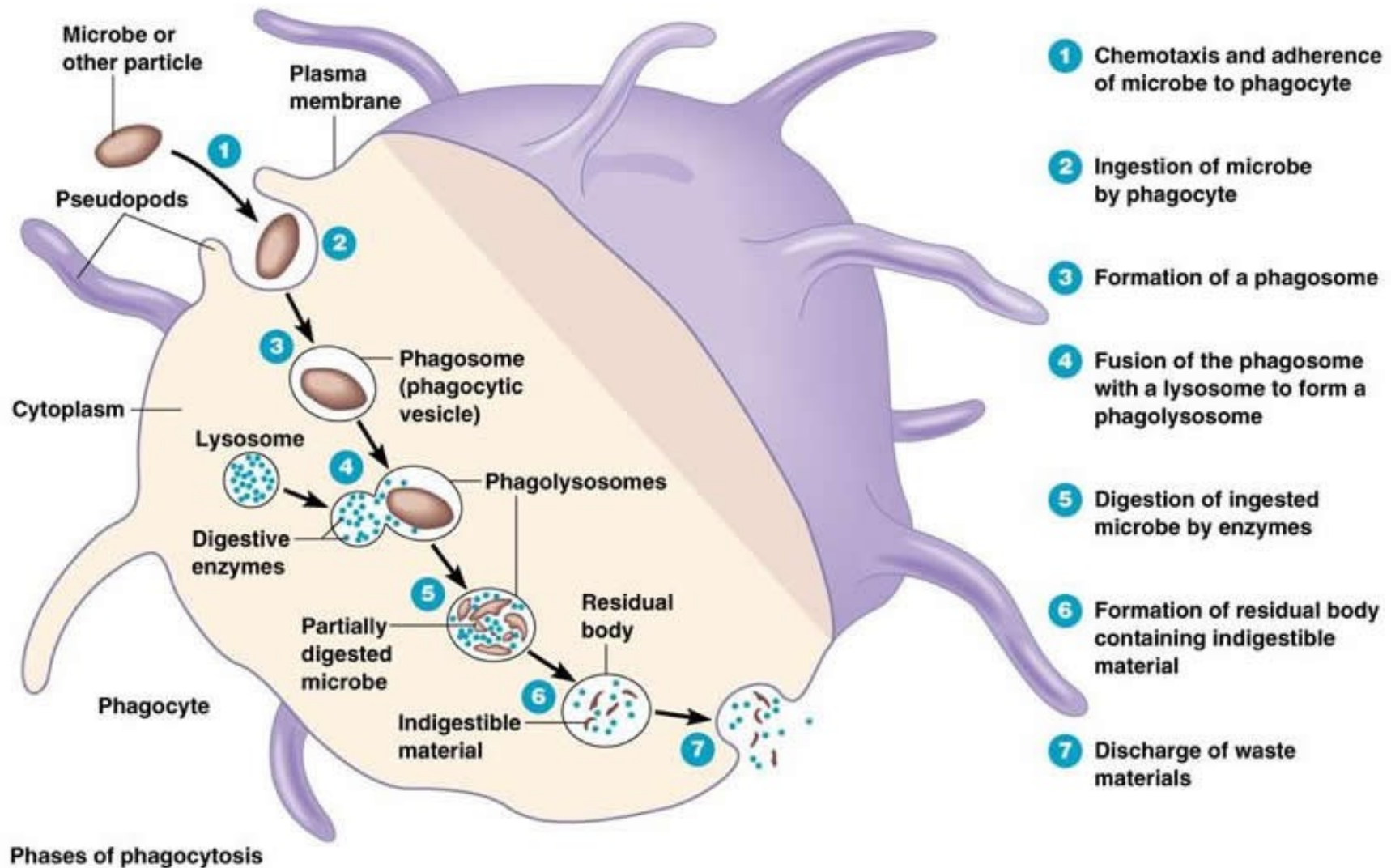
- Entrano negli epatociti per endocitosi mediata da recettore (insulina, epidermal growth factor, glicoproteine)
- Vengono metabolizzate all'interno degli epatociti nei lisosomi (endopeptidasi poi esopeptidasi)

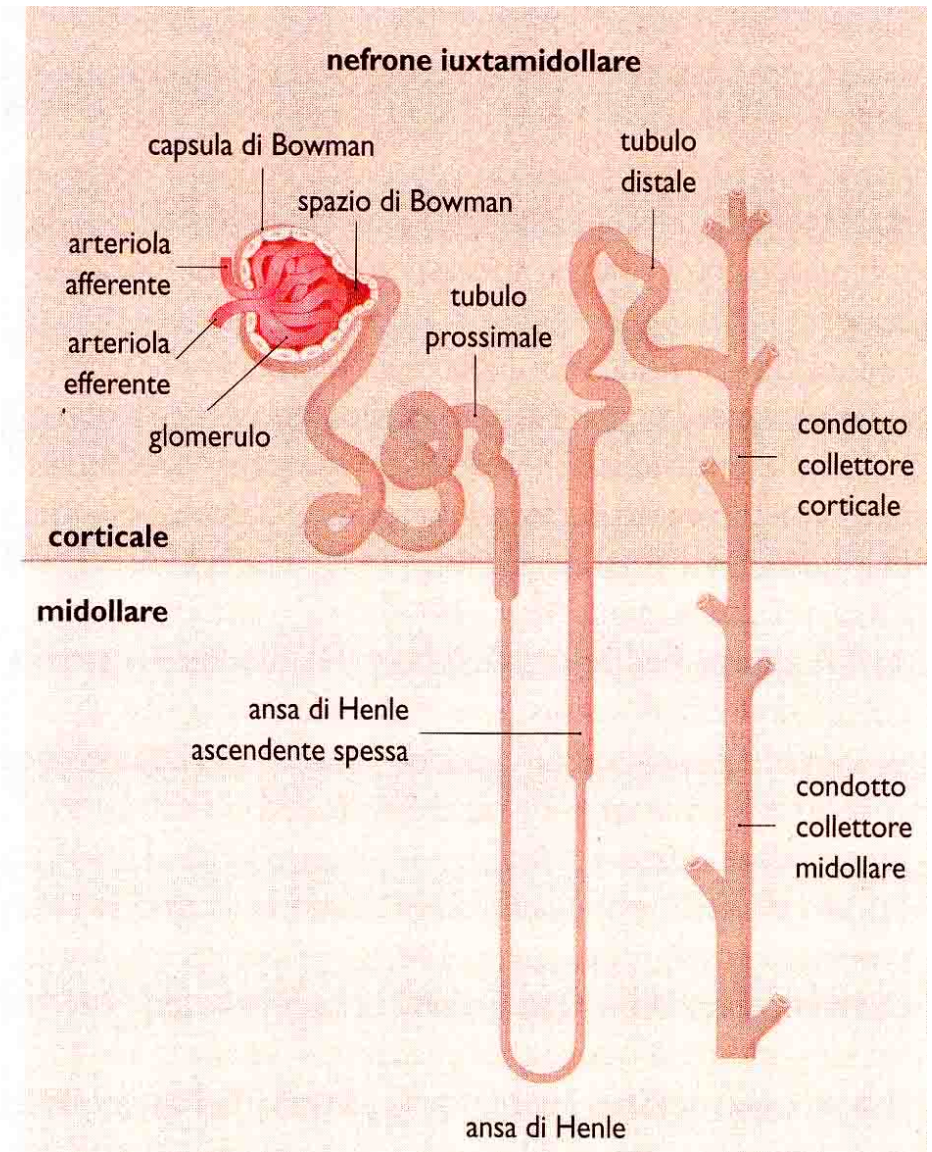
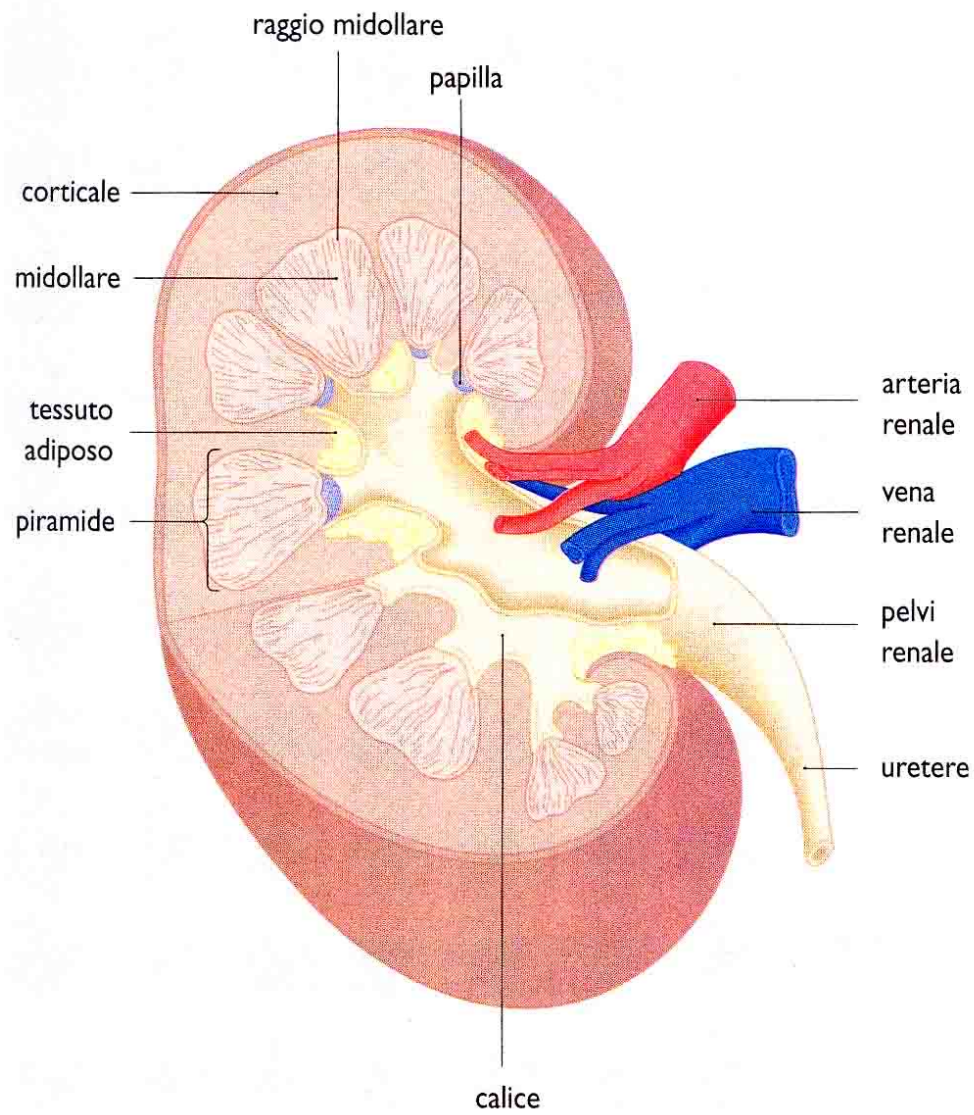


Eliminazione recettore mediata ad opera di altre cellule

- 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





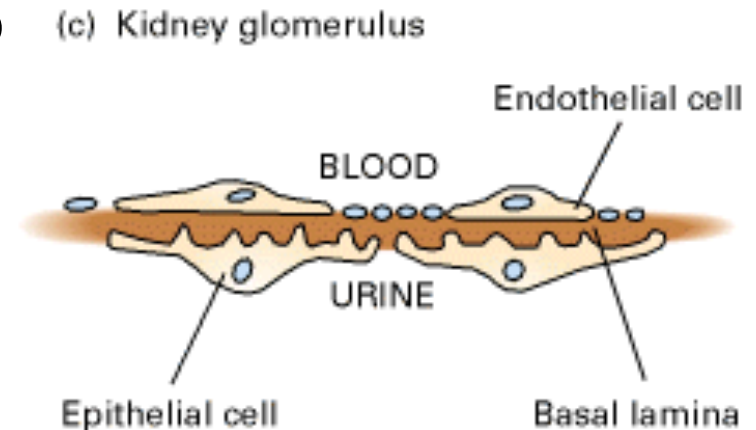
Escrezione renale: filtrazione

- 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

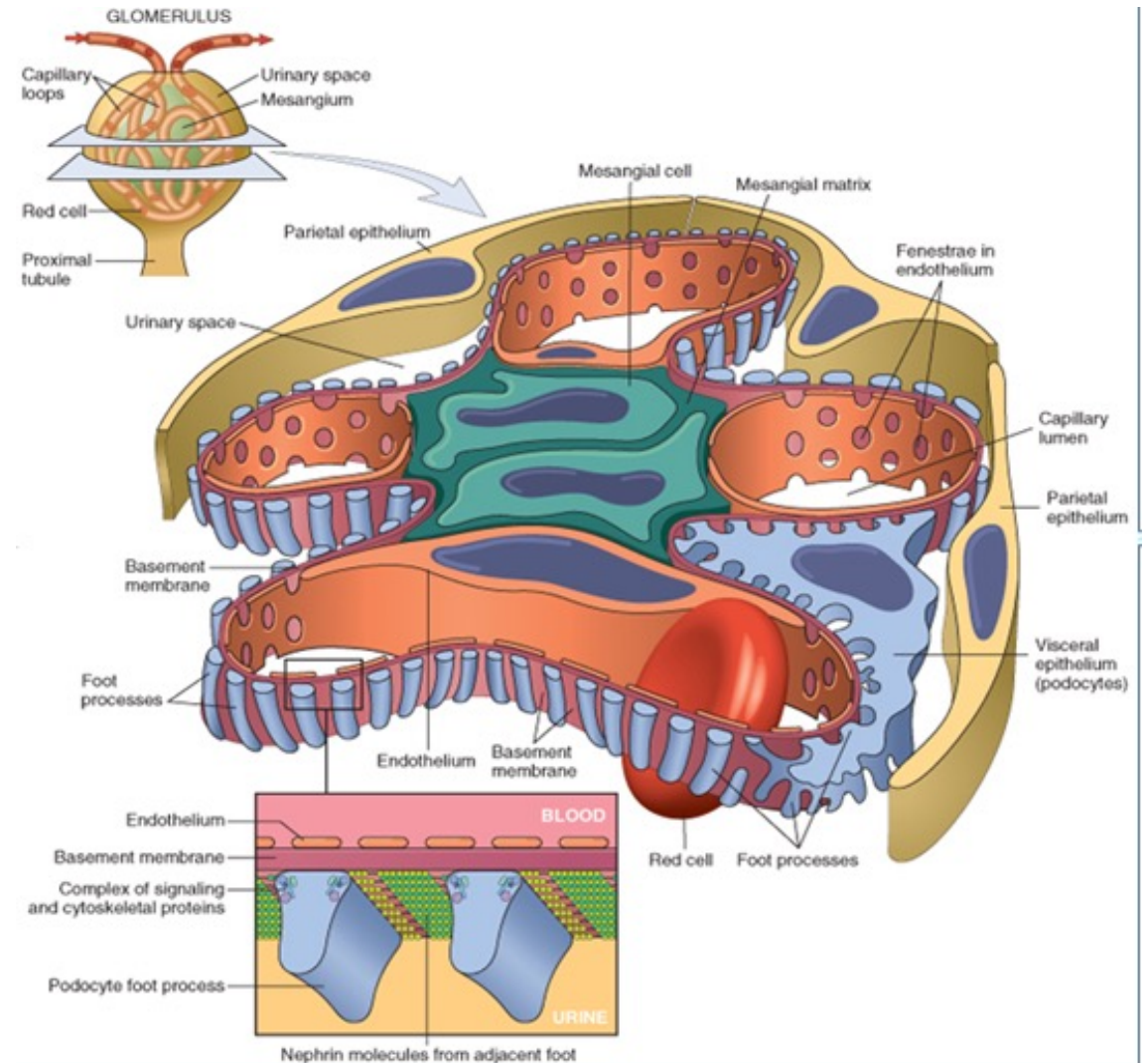
Il filtro glomerulare è costituito da tre strati che separano il lume dei capillari dallo spazio nella capsula di Bowman

- 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



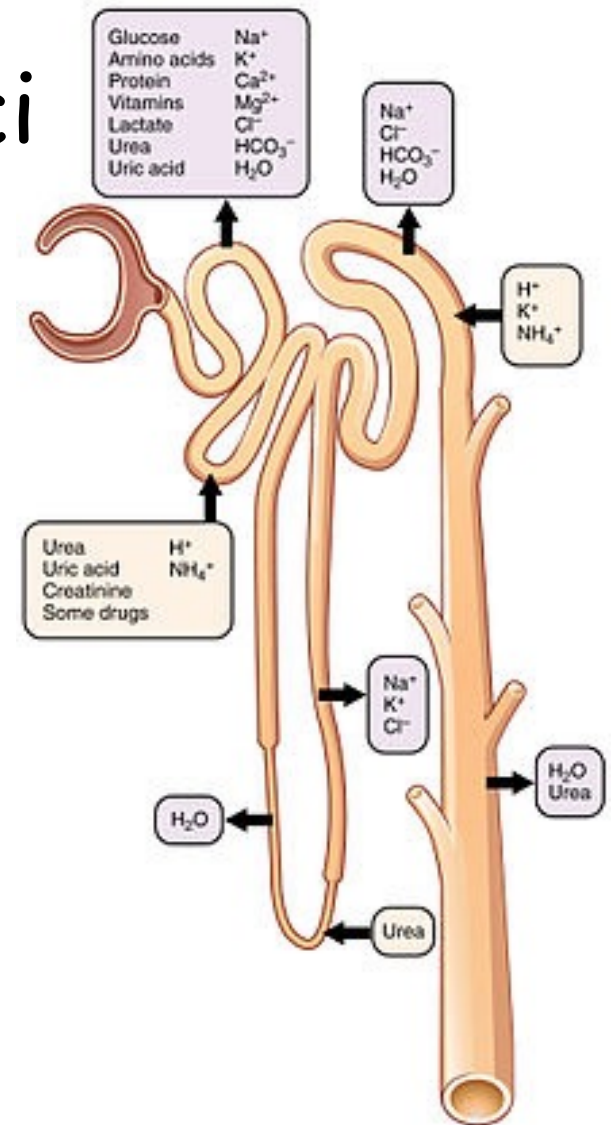
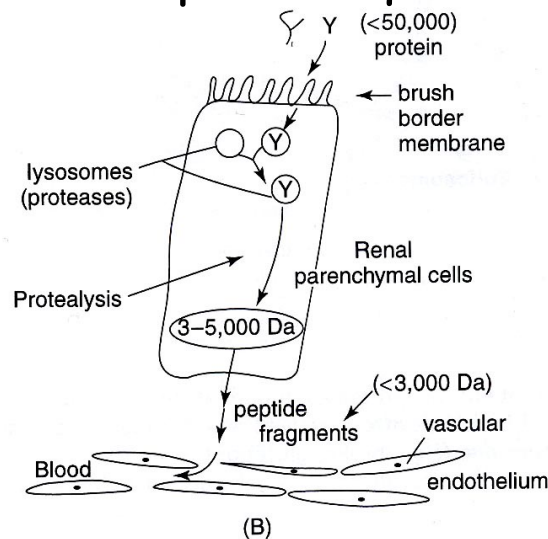
Escrezione renale dei farmaci proteici e peptidici

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



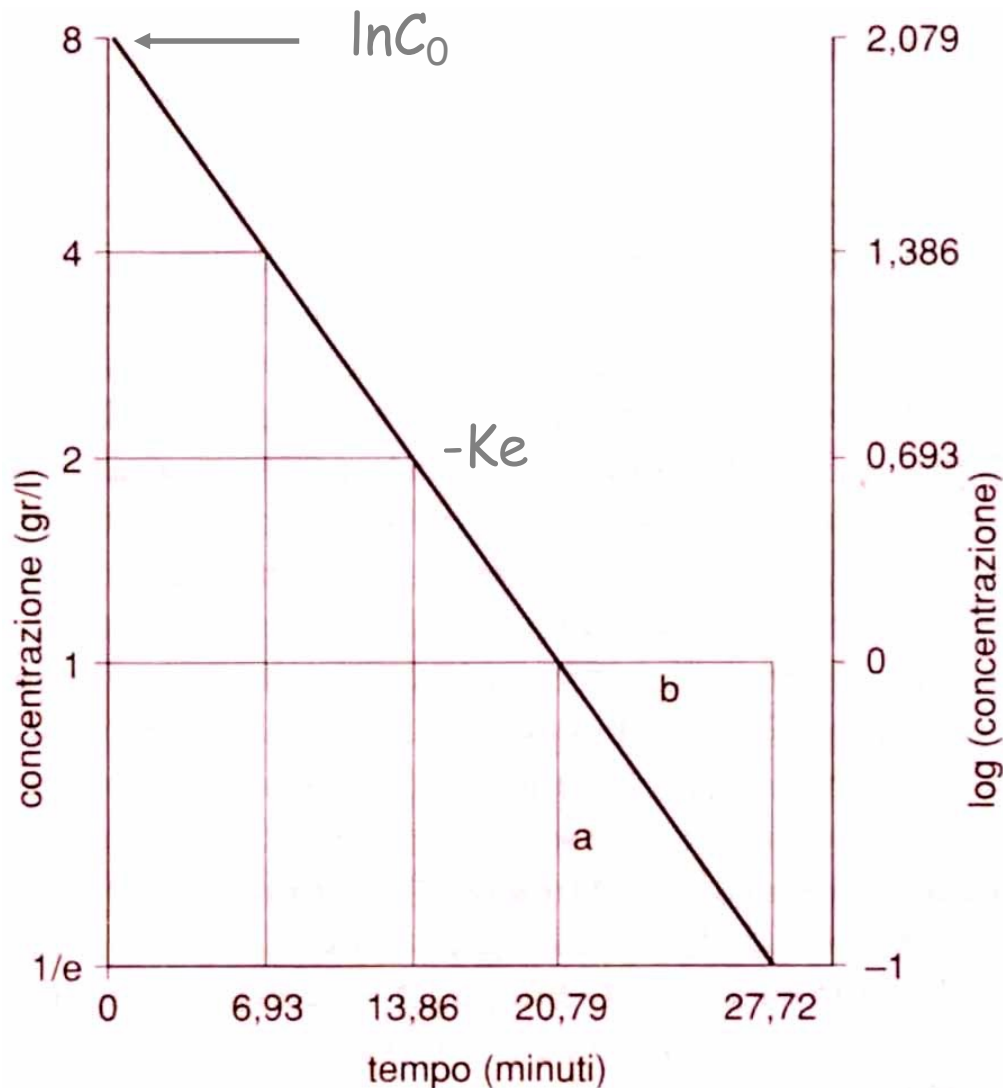
Escrezione renale dei farmaci proteici e peptidici

- 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



Si può modificare l'emivita dei farmaci biologici?

Costante di eliminazione e tempo di dimezzamento (cinetica monocompartimentale di I° ordine)



La velocità di un processo esponenziale può essere espressa in due modi:

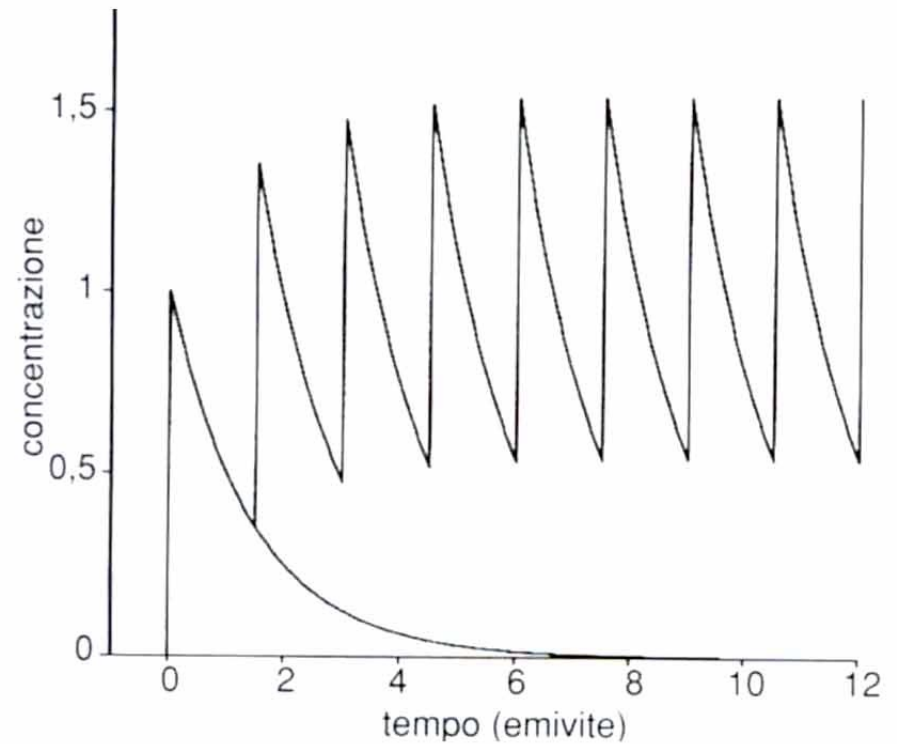
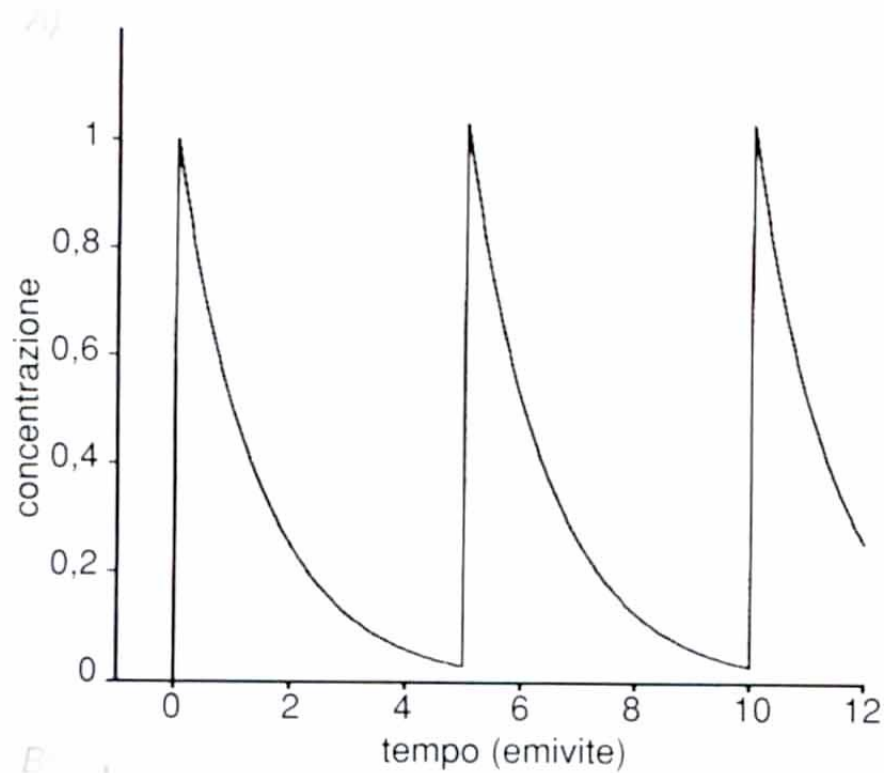
- per mezzo della costante di eliminazione Ke , che esprime la variazione frazionaria per unità di tempo
- per mezzo del tempo di dimezzamento $t_{1/2}$, che è il tempo richiesto per il completamento del 50% del processo.

$t_{\frac{1}{2}}$ o vita media biologica

- Per una cinetica di I ordine il $t_{\frac{1}{2}}$ è indipendente dalla concentrazione iniziale.
- La cinetica di I° ordine avrà un $t_{\frac{1}{2}}$ uniforme per l'intero processo.

- Vogliamo sapere dopo quanto tempo il farmaco sarà completamente eliminato.
- Per convenzione ogni processo asintotico è abolito quando è completato per il 90%.
- $1 t_{\frac{1}{2}} = 50\%$
- $2 t_{\frac{1}{2}} = 50\% + 25\% = 75\%$
- $3 t_{\frac{1}{2}} = 50\% + 25\% + 12.5\% = 87.5\%$
- $4 t_{\frac{1}{2}} = 50\% + 25\% + 12.5\% + 6.25\% = 93.75\%$
- quindi il farmaco si considera eliminato dopo 4 emivite

Somministrazione ripetuta di farmaci



Immunoglobulin	MW (kDa)	$t_{1/2}$ (days)	Rate of Synthesis	Blood Concentration	Total Pool (/kg)	Rate of Metabolism (% per day)
IgG (IgG ₁ , IgG ₂ , IgG ₄)	150	21	32 mg/kg/d (2.2 g/d)	12 mg/ml	1.06 g	6.3%
IgG ₃	150	7–9	NA	NA	NA	NA
HSA (human serum albumin)	60	15–20	10 g/d	~50 mg/ml	3–4 g	5%
IgM	950	9.6	6.9 mg/kg/d	~1 mg/ml	37 mg	11%
IgA	160	5–6	30 mg/kg/d	~2 mg/ml	~220 mg	25%
IgD	175	3	0.4 mg/kg/d	0.02 mg/ml	1.5 mg	37%
IgE	190	2.5	0.016 mg/kg/d	0.3 mg/ml	~20 ng	NA
Mouse IgG ₂	150	5–10 & <1 ^a	NR	NR	NR	NR

Source: Data partly derived from Waldmann and Strober [44].

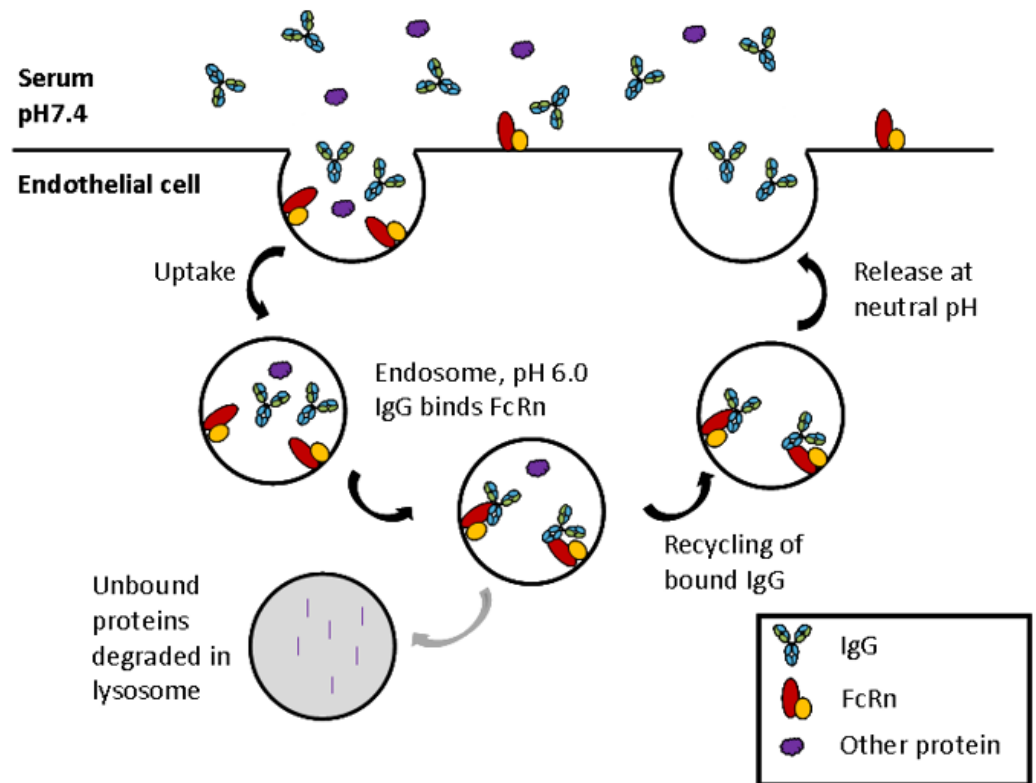
Note: NA, Not available.

NR, Not relevant.

^aHalf-life, $t_{1/2}$ for mouse IgG₂ is 5 to 10 days for the first dose and this value is reduced to less than 1 day after repeated dosing.

L'emivita delle IgG è relativamente lunga

- Il tempo di emivita di un anticorpo nel plasma è molto lungo anche per la proprietà delle IgG di legare delle proteine specifiche per Fc (FcRn o recettore di Brambell). Questa interazione stabilizza le IgG e previene la loro degradazione nel plasma.
- FcRn è un eterodimero di una catena alfa di 50 kDa ed una beta di 18 kDa chiamata beta 2-microglobulina.
- Il meccanismo molecolare con cui il recettore di Brambell protegge gli anticorpi comprende il legame a livello degli endosomi e la conseguente inibizione della degradazione da parte delle peptidasi nel sistema endosoma/lisosoma e le riporta sulla membrana dove vengono riciclati.



Utilizzo della porzione Fc per stabilizzare proteine ingegnerizzate: l'etanercept

- Questo fenomeno è stato utilizzato per stabilizzare proteine di fusione prodotte a scopo terapeutico.
- Etanercept (Enbrel™), una proteina di fusione ricombinante fra il recettore per TNF α ed il frammento Fc è stata utilizzata con successo nel trattamento dell'artrite reumatoide.
- Efficacia clinica Etenercept legata anche all'aumento del tempo di emivita dovuto all'interazione del frammento Fc con il recettore di Brambell

