

CTF
Corso Farmaci Biologici

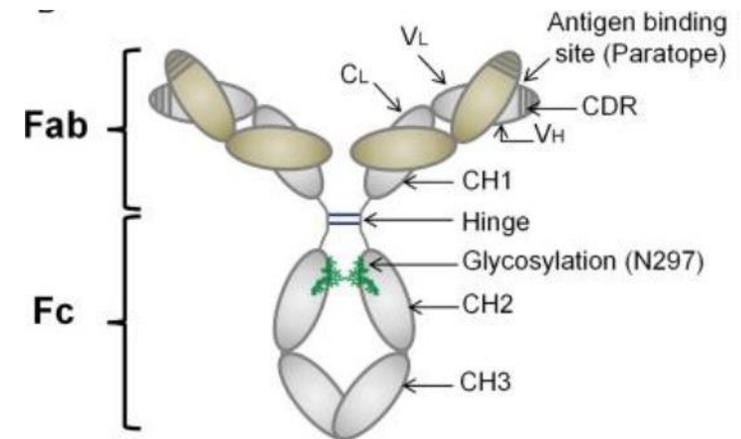
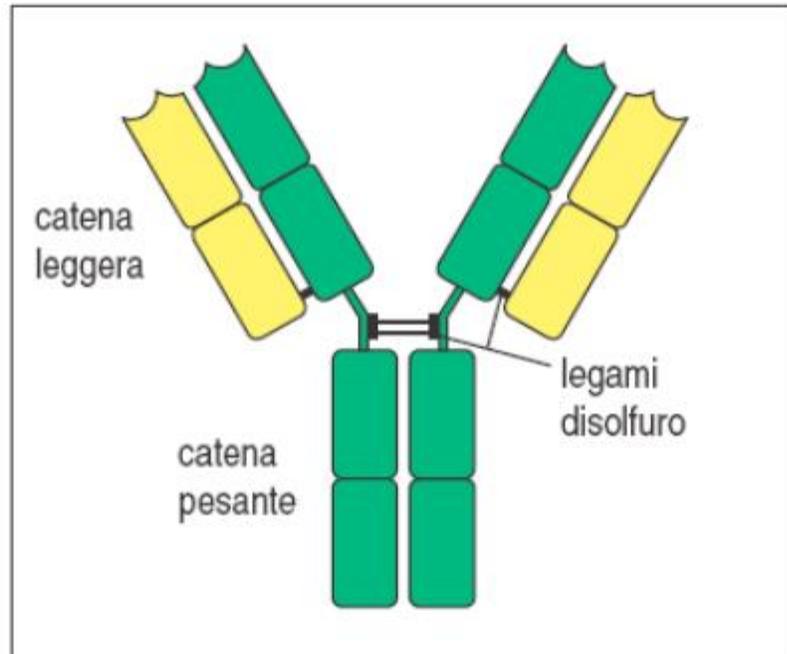
Gli anticorpi

generalità e caratteristiche dell'impiego a scopo
terapeutico

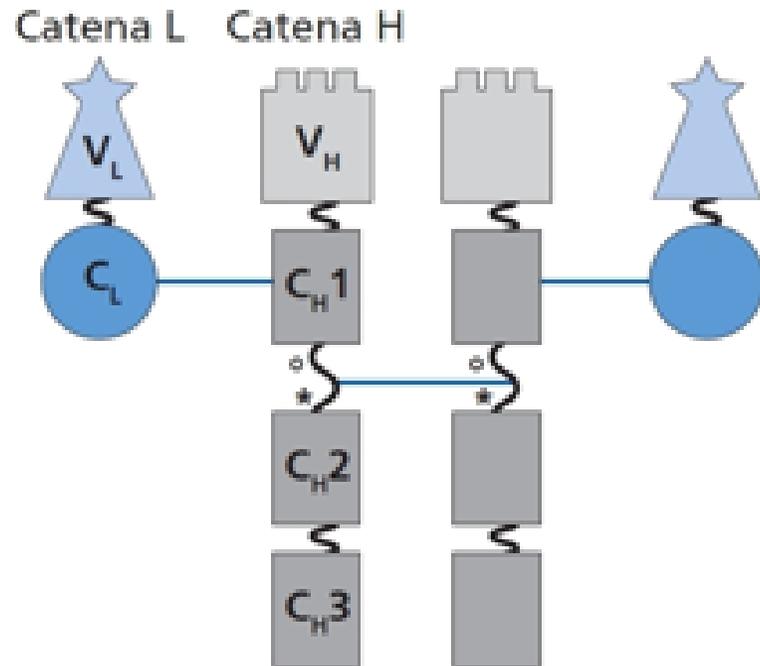
Gl anticorpi appartengono alla famiglia delle immunoglobuline (**Ig**), glicoproteine prodotte e secrete nel sangue dai linfociti B dei vertebrati in seguito al processo di maturazione in plasmacellule indotto dall'esposizione a un antigene.

Anticorpi = 4 catene:

2 pesanti (H) e 2 leggere (L) legate tra di loro da ponti disolfuro

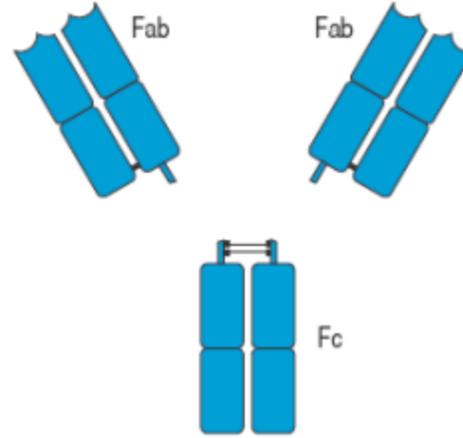
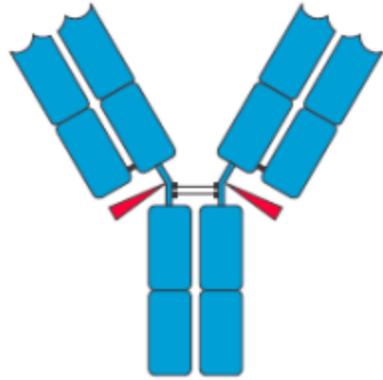


Nella regione N-terminale di entrambe le catene L e H delle IgG sono presenti due domini diversi chiamati domini variabili, VL e VH. Il DNA codificante per il dominio variabile è formato da numerose porzioni geniche che vengono arrangiate durante la generazione dei linfociti B, dando luogo a una miriade di ricombinazioni, ciascuna delle quali è contenuta in un clone di plasmacellule.



La struttura di una Ig è data dall'unione di due eterodimeri tramite ponti disolfuro (mostrati con una linea blu). Ogni monomero contiene una catena L formata dai domini VL e CL e una catena H composta da un dominio VH e le regioni CH 1-3. Nella porzione di collegamento CH1-3 sono presenti siti di riconoscimento per gli enzimi papaina (°) e pepsina (*).

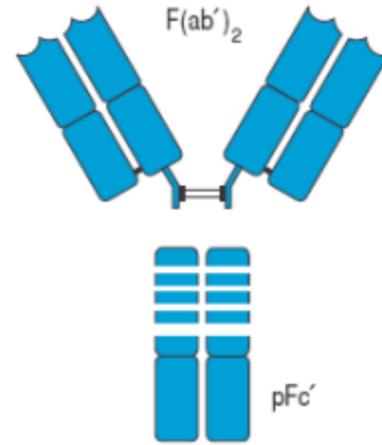
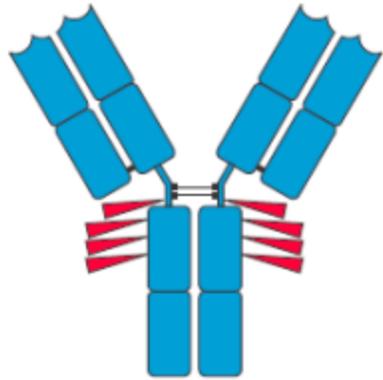
Tagli proteolitici indotti dalla papaina



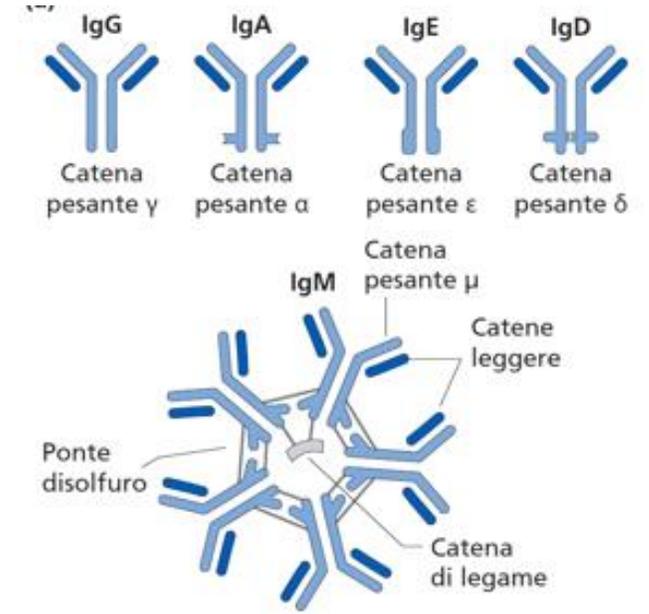
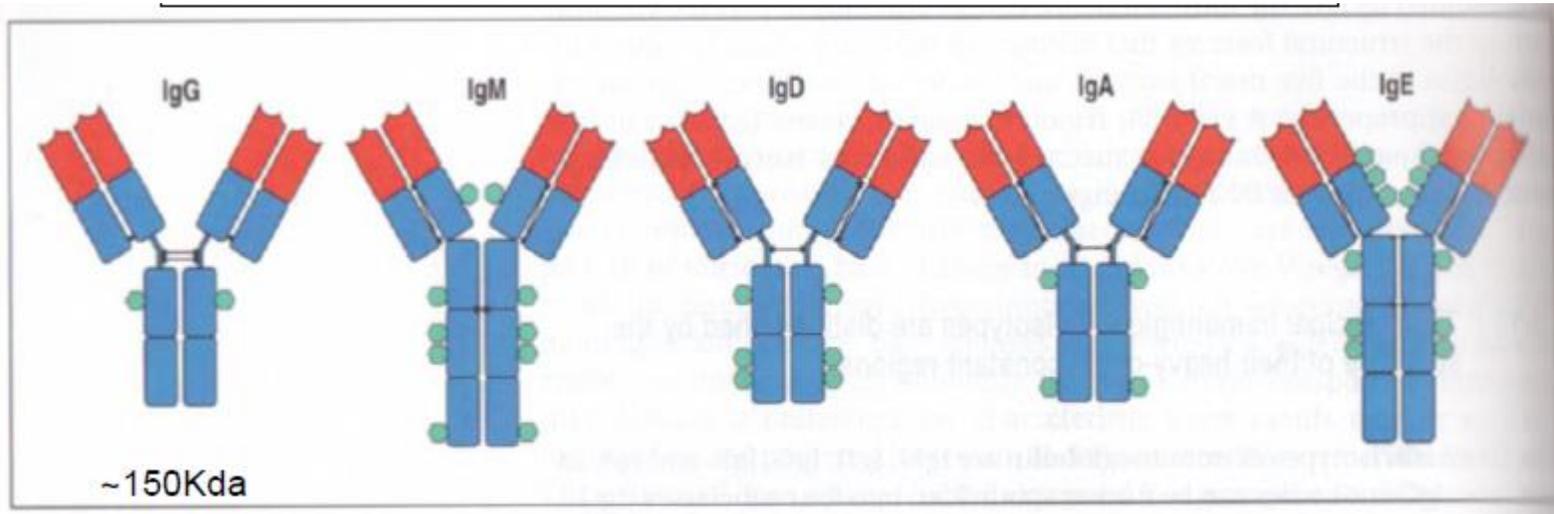
**Fab = Frammento
legante
l'antigene (Ag)**

**Fc = Frammento
cristallizzabile**

Tagli proteolitici indotti dalla pepsina



5 diversi classi (isotipi) attivano differenti funzioni effettrici



E sono dotate di caratteristiche differenti Tab seguente



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	+++	-	++	+	+	-	-	-

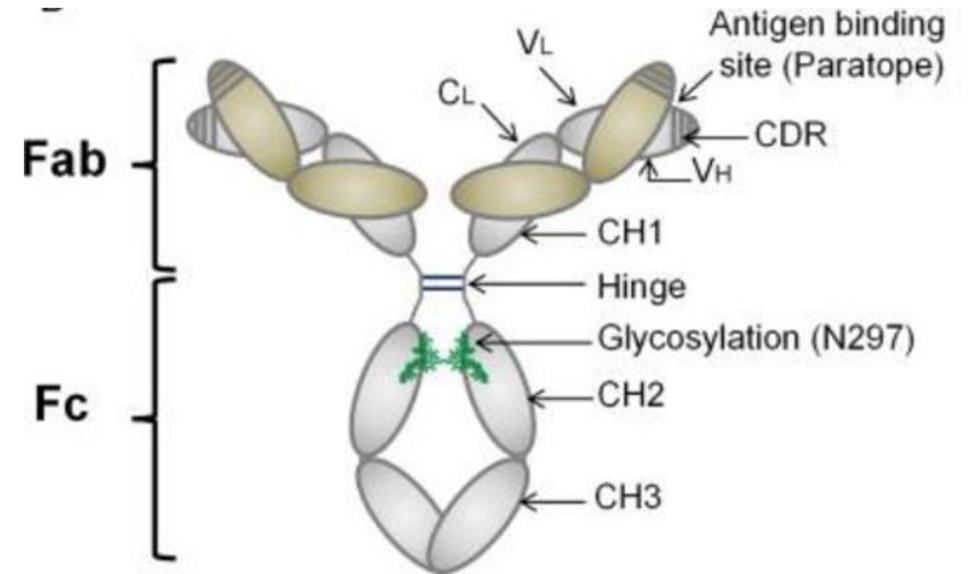
All'interno dei tratti VL e VH si riconoscono delle regioni non contigue denominate regioni determinanti la complementarità (Complementarity-Determining Regions, **CDR**) fondamentali per il riconoscimento dell'antigene.

Gli aminoacidi che compongono queste anse entrano in contatto diretto con aminoacidi presenti sull'epitopo (la porzione dell'antigene che viene riconosciuta dall'anticorpo)

Non si formano legami covalenti ma si sfruttano forze di attrazione (idrofobiche, di van der Waals, elettrostatiche) che generano un'interazione altamente complementare che è tra le più forti in biologia.

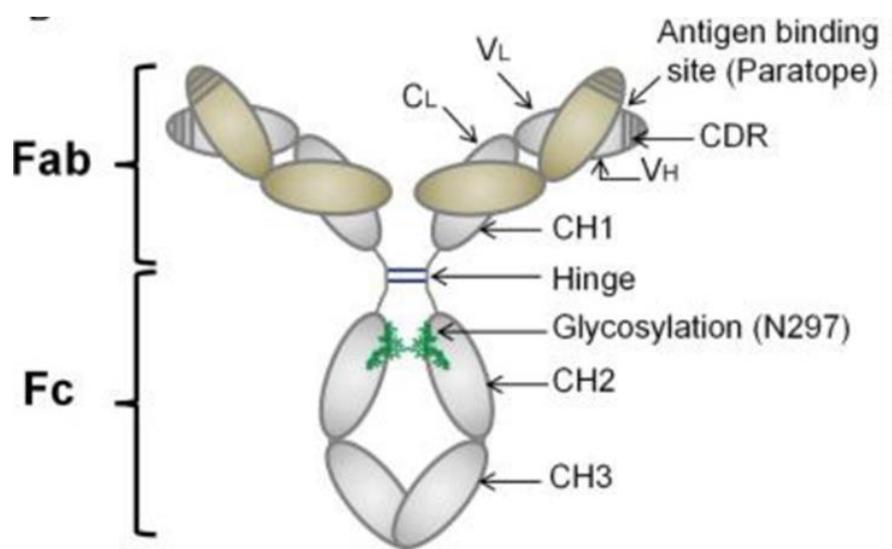
Il legame dell'anticorpo all'antigene è:

- monospecifico, un anticorpo riconosce un solo tipo di antigene,
- bivalente, cioè una molecola di anticorpo lega due molecole di antigene.

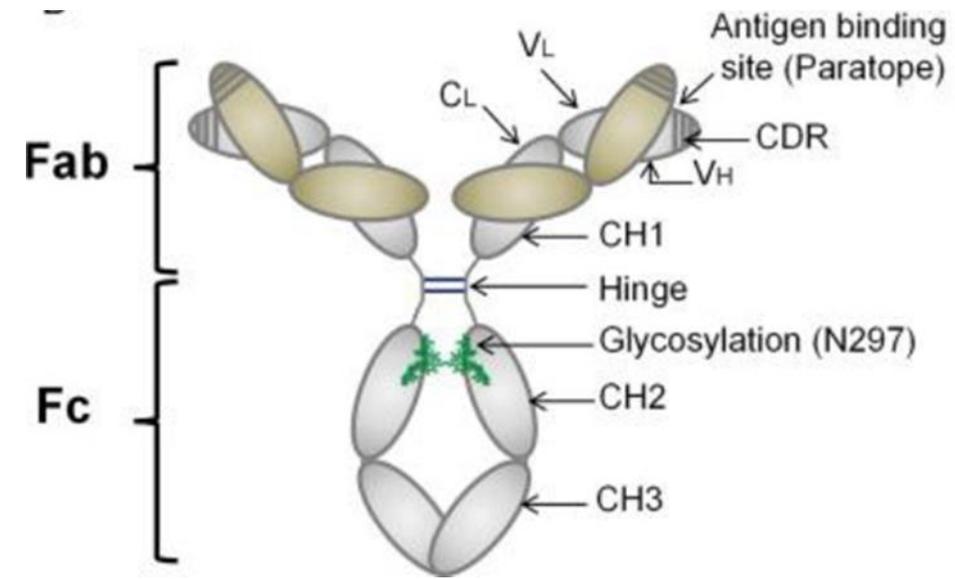


Il legame proteina-proteina che avviene nell'interazione tra antigene e anticorpo è un esempio di come le macromolecole, nonostante la complessità e le grandi dimensioni, possano formare legami molto forti grazie alla complementarità di superfici d'interazione (come avviene nel legame di nucleotidi complementari tra i due filamenti di una catena di DNA o fra proteine e acidi nucleici).

Forze non covalenti	Origine	
Forze elettrostatiche	Attrazione tra cariche opposte	$\text{—NH}_3^+ \quad \text{OOC}^-$
Legami ad idrogeno	Idrogeno condiviso tra atomi elettronegativi (N, O)	$\begin{array}{c} > \text{N} \text{—} \text{H} \text{—} \text{O} = \text{C} < \\ \delta^- \quad \delta^+ \quad \delta^- \end{array}$
Forze di Van der Waals	Oscillazioni delle nubi elettroniche attorno alle molecole polarizzano in modo opposto gli atomi adiacenti	$\begin{array}{ccc} \delta^+ & \longleftrightarrow & \delta^- \\ \delta^- & \longleftrightarrow & \delta^+ \end{array}$
Forze idrofobiche	I gruppi idrofobici interagiscono sfavorevolmente con l'acqua e tendono ad associarsi per escludere le molecole di acqua. L'attrazione avviene anche per le forze di Van der Waals	$\begin{array}{c} \text{H} > \text{O} & \delta^+ & \text{H} & \text{O} < \text{H} \\ & \delta^- & & \delta^- & \\ \text{H} < \text{O} & & & & \end{array}$



Il CDR forma così legami molto forti grazie alla complementarità di superfici d'interazione, come avviene nel legame di nucleotidi complementari tra i due filamenti di una catena di DNA o fra proteine e acidi nucleici.



La porzione CH2 della catena pesante è responsabile del legame degli anticorpi alle funzioni effettrici. Infatti, in questo dominio si trovano:

- il sito di legame per il fattore C1q del complemento, responsabile dell'attività **citotossica dipendente dal complemento (Complement-Dependent Cytotoxicity, CDC)**;
- il sito di legame per il recettore delle IgG (chiamato FcγR), espresso dalle cellule effettrici dell'immunità, come macrofagi e leucociti, che sono responsabili dell'attività citotossica definita **citotossicità mediata da cellule e dipendente da anticorpi** (Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity ADCC). Attraverso questi due legami le IgG portano all'eliminazione delle cellule che esprimono l'antigene tramite lisi, fagocitosi o tossicità cellulo-mediata in modo più o meno efficiente a seconda dell'idiotipo (Tabella 10.1).

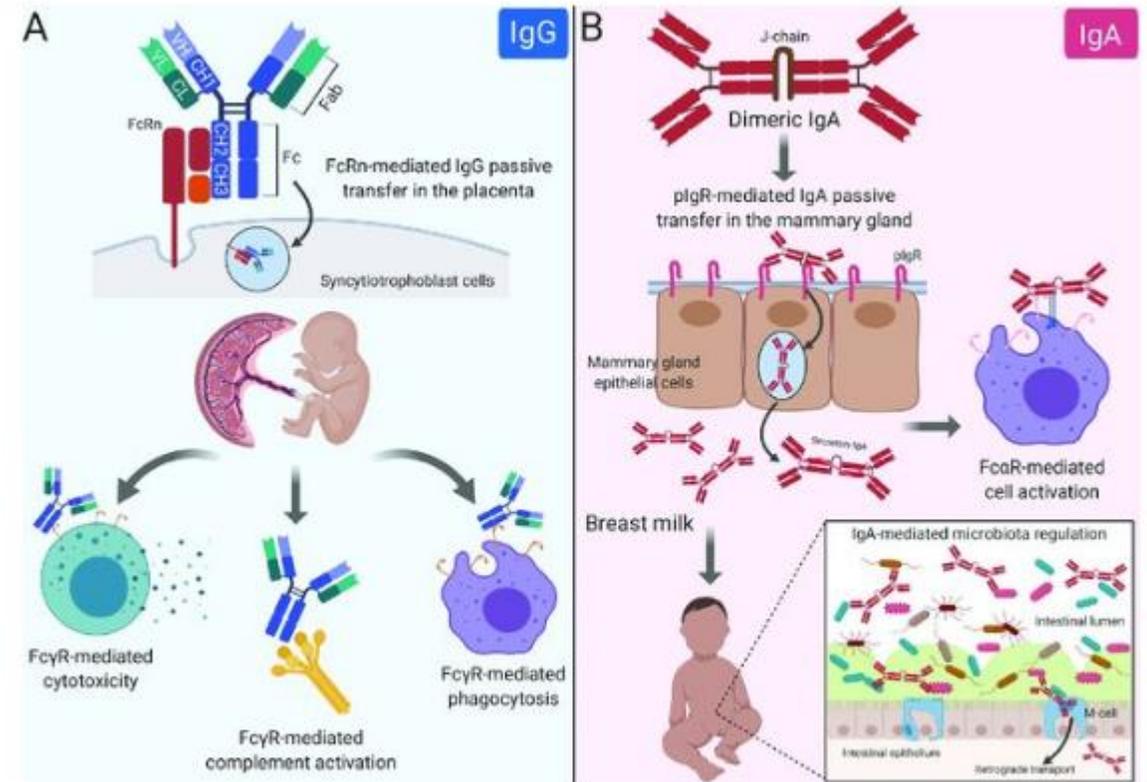
Tabella 10.1 Caratteristiche delle diverse classi di anticorpi.

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA	IgM	IgE	IgD
Catena H	γ1	γ2	γ3	γ4	α	μ	ε	δ
Concentrazione plasmatica (mg/mL)	9	3	1	0,5	2,1	1,5	5 · 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	+++	-	++	+	+	-	-	-

Il riciclo è un aspetto molto importante nell'azione fisiologica e nell'attività farmacologica degli anticorpi. Le IgG insieme all'albumina costituiscono l'80% delle proteine plasmatiche e hanno entrambe un'emivita di circa 20 giorni.

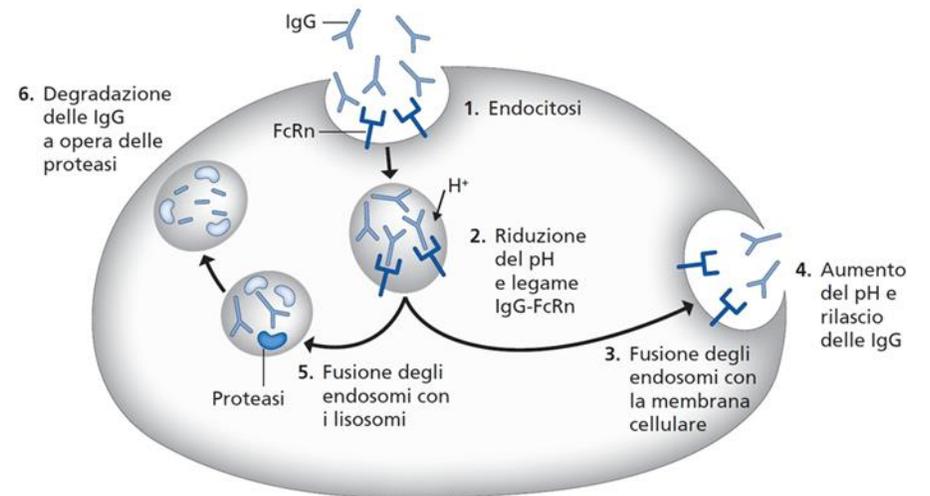
L'emivita delle IgG dipende da un recettore chiamato recettore neonatale del frammento Fc (neonatal Fc receptor), o **FcRn**. Il nome deriva dalla scoperta di questo recettore come mediatore chiave del trasferimento passivo dell'immunità acquisita nei neonati, in quanto responsabile del trasporto materno-fetale di IgG attraverso la placenta e del trasporto delle IgG contenute nel latte materno attraverso l'intestino dei neonati.

Fig 1. Maternal antibody passive transfer and functional activity in the neonate. (A) IgG passive transfer in the placenta influences FcγR-mediated cell cytotoxicity, phagocytosis, and complement activation in the developing fetus/newborn. (B) IgA passive transfer in the mammary gland results in FcαR- and IgA-mediated cell activation and microbiota ... [Read more](#)



Il legame con FcRn avviene a livello dell'interfaccia CH2-CH3 sul frammento Fc ed è strettamente dipendente dal pH, con affinità elevata a pH 6,5 e quasi nulla a pH 7,5.

Una delle funzioni più studiate di **FcRn** è di proteggere le IgG (e l'albumina) dal catabolismo intracellulare. Tale funzione è svolta nelle cellule che esprimono questo recettore, ossia le cellule ematopoietiche, l'endotelio vascolare e le cellule epiteliali polarizzate che ricoprono le mucose.



L'utilizzo degli anticorpi per qualsiasi applicazione sperimentale o clinica prevede la disponibilità di quantità notevoli di molecole. Non potendo utilizzare linfociti B in coltura, poiché vanno incontro ad apoptosi quando coltivati in vitro, agli inizi degli anni '70 del secolo scorso si cercò di sfruttare la risposta immunitaria generata dall'esposizione di un organismo animale all'antigene

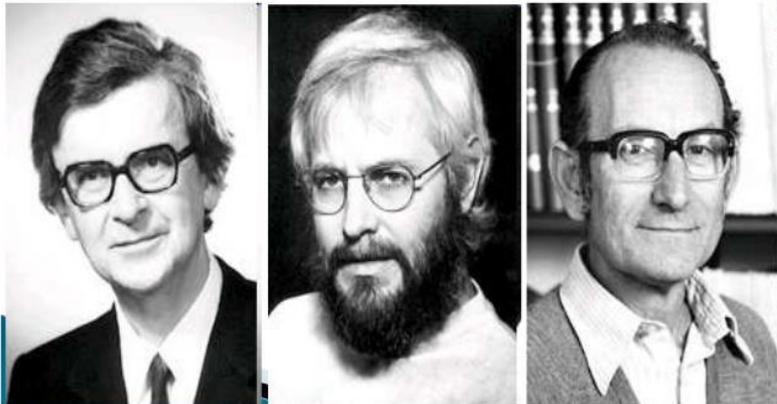
Tuttavia i linfociti B coltivati in vitro, muoiono dopo brevissimo tempo.

Nobel Prize Award in Medicine and
Physiology in 1984

Prof. Niels Kaj Jerne

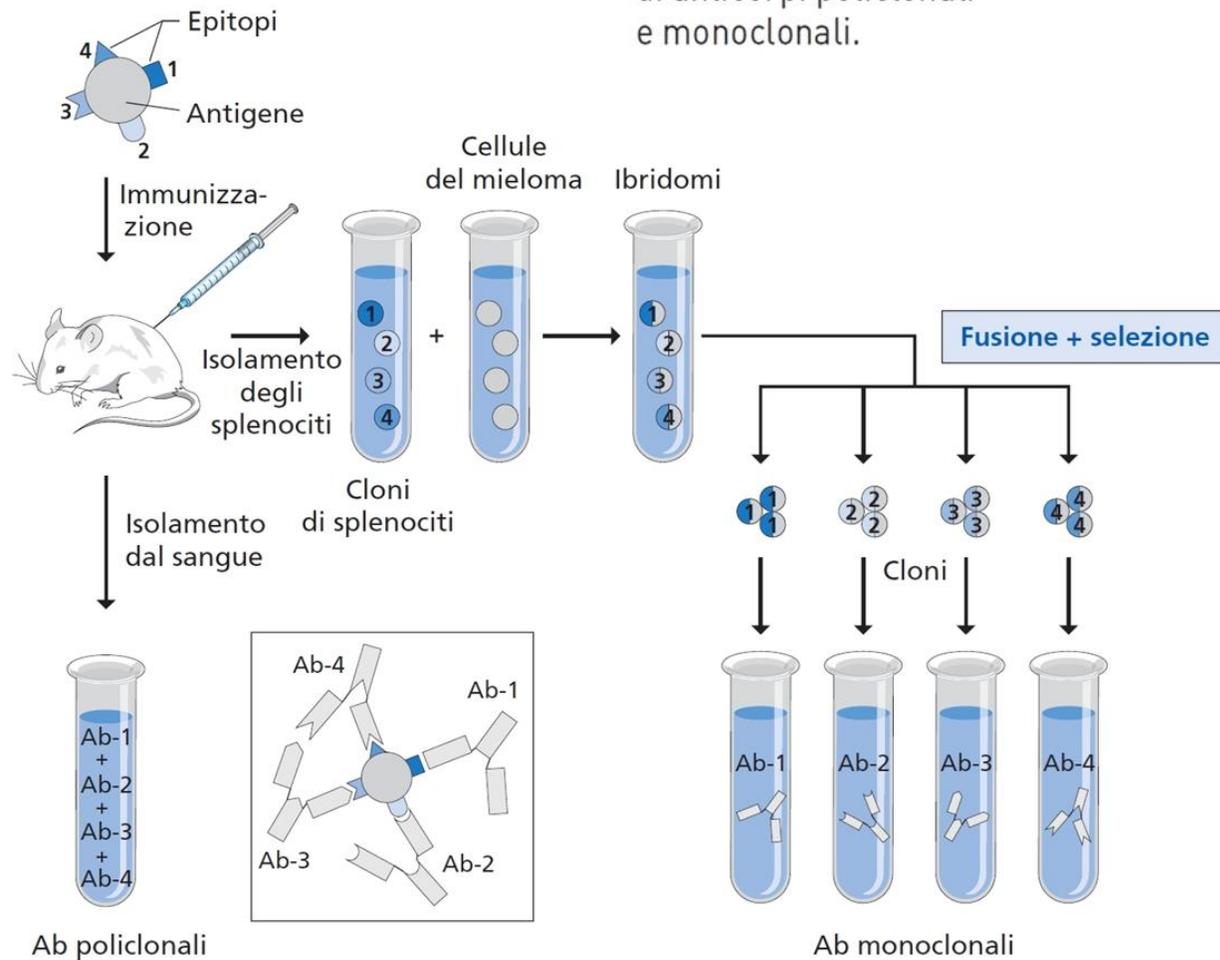
Prof. Georges J. F.
Köhler

Prof. César Milstein



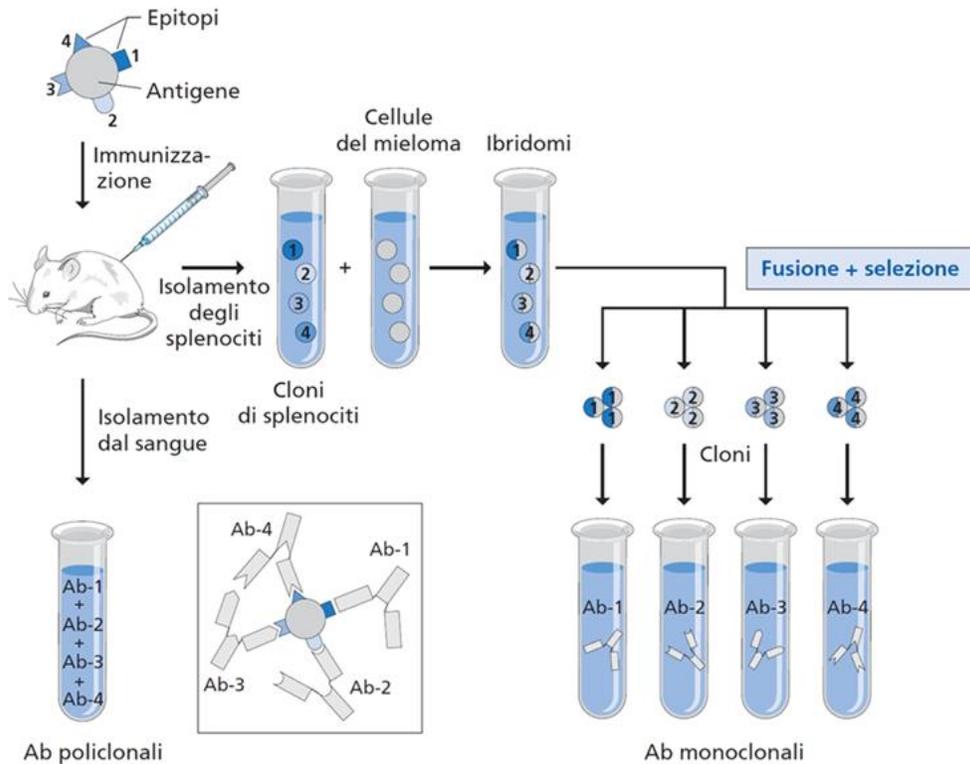
La scoperta degli anticorpi monoclonali (mAb) risale al 1975, quando 2 ricercatori Cesar Milstein e Georges Kohler (che nel 1984 vinsero il premio Nobel per la medicina) misero a punto la tecnica per la sintesi degli anticorpi monoclonali

Figura 10.2 Produzione di anticorpi policlonali e monoclonali.



Tecnica per la sintesi degli anticorpi monoclonali

1. immunizzazione di un modello animale, ottenuta tramite protocolli che generalmente prevedono la somministrazione dell'antigene a topi di laboratorio attraverso iniezioni, ripetute a intervalli di alcuni giorni, di una miscela di antigene e un agente adiuvante (per esempio, il reagente di Freund, una miscela di olio e acqua che stimola la risposta immunitaria), inducendo così l'attivazione dei linfociti;
2. isolamento dei linfociti B dalla milza dell'animale immunizzato;
3. fusione cellulare per formare l'ibridoma, in cui i linfociti B isolati dal topo immunizzato sono miscelati con cellule di una linea cellulare di mieloma, in un rapporto 5:1 e in presenza di PEG (emulsionante);
4. crescita selettiva dell'ibridoma, utilizzando un mezzo di coltura che permette la crescita degli ibridomi di plasmacellule trasformate;
5. selezione clonale, in cui le cellule sopravvissute alla selezione sono coltivate tramite diluizioni in modo da separare fisicamente i doni di plasmacellule;
6. identificazione e propagazione del clone idoneo, attraverso l'analisi delle proprietà dell'anticorpo secreto.



(alcuni impieghi: timoglobulina, farmaco utilizzato nell'immunosoppressione e composto da una miscela di anticorpi purificati dal siero di conigli immunizzati contro CD3 umano)

TUTTAVIA, gli anticorpi monoclonali prodotti tramite la metodologia dell'ibridazione somatica descritta a fianco sono di derivazione murina perché si ottengono dal riarrangiamento genico nei linfociti dell'animale immunizzato.

Essendo proteine di origine diversa da quella umana la loro somministrazione nell'uomo genera risposte avverse che ne limitano o addirittura precludono l'impiego terapeutico:

- **inefficienza delle funzioni effettrici**

la capacità degli anticorpi monoclonali murini di legare i recettori FcγR e il complemento umani è ridotta, diminuendo così l'attività citotossica del sistema immunitario sulle cellule che esprimono l'antigene;

- **immunogenicità**

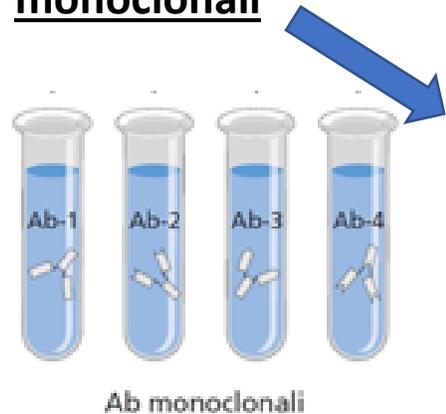
induzione di una risposta immunitaria specifica denominata HAMA (Human Anti-Mouse Antibodies) diretta contro l'anticorpo stesso che, da un lato, riduce la capacità di indurre una risposta biologica rendendo inefficace la terapia e, dall'altro, forma degli immunocomplessi che stimolano reazioni immunologiche, talvolta anche gravi;

- **breve emivita**

causata dalla bassa affinità fra gli anticorpi di topo e il recettore umano FcRn che media il riciclo delle IgG (soprattutto la sottoclasse G1), aumentando la degradazione intracellulare degli anticorpi.

Quindi ...

Sono stati quindi progressivamente sviluppati tipologie successive di anticorpi monoclonali e, soprattutto, occorre sottolineare che le metodiche di ingegneria genetica forniscono la possibilità di clonare i geni delle IgG monoclonali



E' quindi possibile clonare i geni codificanti per qualsiasi anticorpo monoclonale d'interesse in vettori di espressione, così da ottenere versioni ricombinanti utilizzabili in linee cellulari diverse dagli ibridomi e suscettibili di qualsiasi modificazione per ottenere anticorpi umanizzati, ingegnerizzati o derivati anticorpali.

L'invenzione di procedure sperimentali che permettessero generazione, modificazione e produzione su larga scala di anticorpi monoclonali ha reso queste molecole strumenti insostituibili in terapia, diagnosi e ricerca.

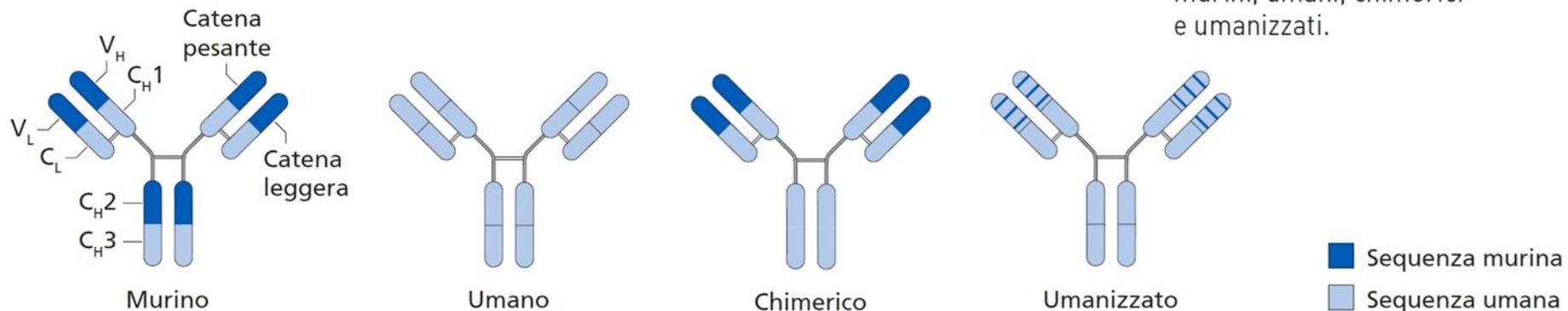


Figura 10.3 Confronto tra anticorpi murini, umani, chimerici e umanizzati.

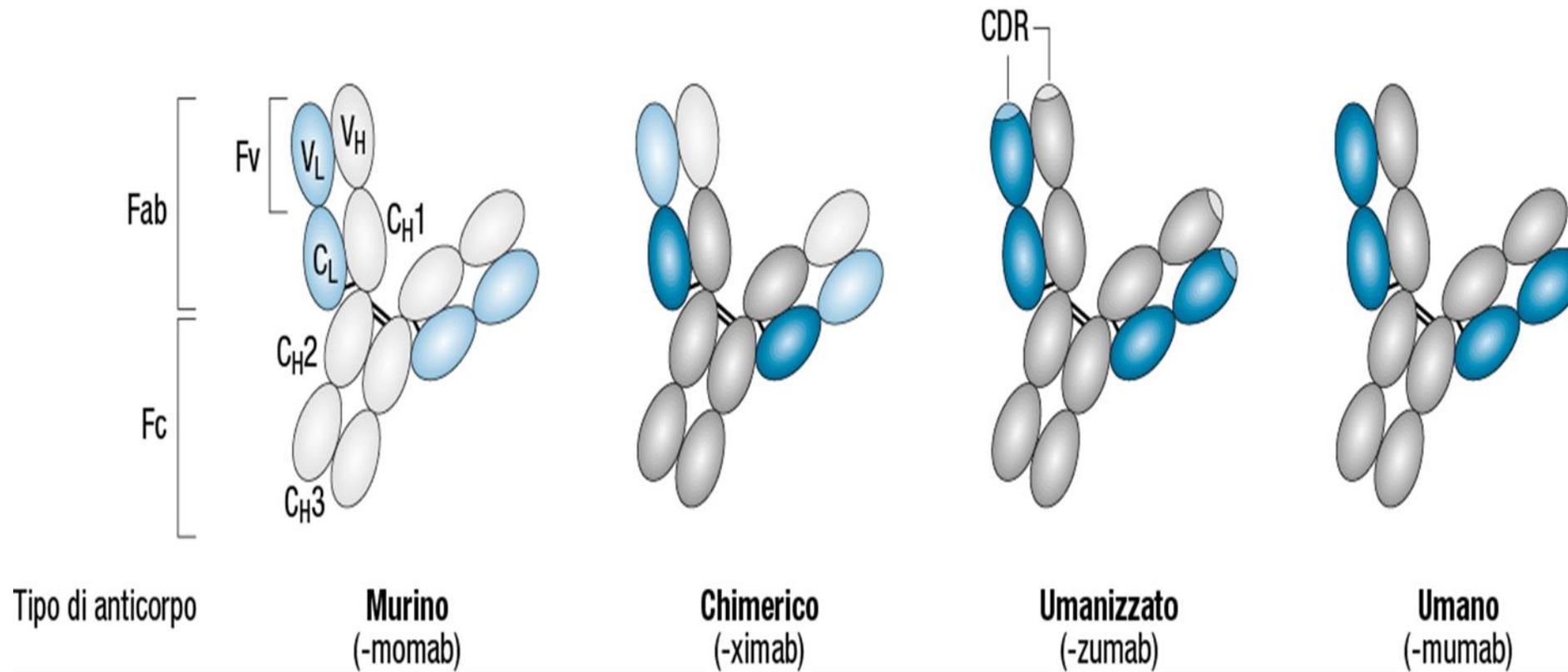


Figura 44.1 Evoluzione degli anticorpi monoclonali terapeutici.

16032021

La nomenclatura degli anticorpi monoclonali
 Il nome generico degli anticorpi monoclonali segue
 uno schema di denominazione internazionale:

- un prefisso variabile
- una radice correlata al bersaglio
- una seconda radice legata alla specie da cui deriva
- una desinenza invariabile, “mab”, al termine del nome.

-o- si riferisce ad anticorpi completamente di topo,
 -xi- ai chimerici,
 -zu- agli umanizzati
 -u- ad anticorpi completamente umani.

Esempi: muromomab, di derivazione completamente murina,
 infliximab, che è chimerico,
 adalimumab, completamente umano.

mAb che hanno come bersaglio il sistema immunitario contengono nel
 nome -mi- o -li(m) mentre gli anticorpi impiegati nella terapia
 antitumorale contengono nel nome -tu-, come il trastuzumab,
 umanizzato, e il rituximab, chimerico.

Lista di radici per la
 nomenclatura di un anticorpo monoclonale^{[4][5][6]}

Prefisso	radice: Target			radice: Fonte		Suffisso
	Vecchio	Nuovo	Significato		Significato	
variable	-anibi-	—	Angiogenesi (inibitore)	-a-	ratto	-mab
	-ba(c)-	-b(a)-	Batterio	-e-	criceto	
	-ci(r)-	-c(i)-	Sistema circolatorio	-i-	primate	
	-fung-	-f(u)-	Fungo	-o-	topo	
	-ki(n)-	-k(i)-	Interleuchina	-u-	uomo	
	-les-	—	Infiammazione lesioni	-xi-	chimerico (umano/esterno)	
	-li(m)-	-l(i)-	Sistema immune	-zu-	umanizzato	
	-mul-	—	Sistema muscoloscheletrico	-xizu-*	chimerico/ibrido umanizzato	
	-ne(u)(r)-	-n(e)-*	Sistema nervoso	-axo-	ibrido ratto/topo (see <i>Anticorpo trifunzionale</i>)	
	-os-	-s(o)-	Osso			
	-toxa-	-tox(a)-	Tossine			
	-co(l)-	-t(u)-	Tumore del colon			
	-go(t)-		Tumore del testicolo			
	-go(v)-		Carcinoma dell'ovaio			
	-ma(r)-		Tumore della mammella			
-me(l)-	Melanoma					
-pr(o)-	Carcinoma della prostata					
-tu(m)-	Tumori miscellanea					
-vi(r)-	-v(i)-		Virus			

* Sotto discussione al dicembre 2009.

Nomenclature of Monoclonal Antibodies

Prefix	Target		Source		Suffix
<i>variable</i>	<i>-o(s)-</i>	bone	<i>-u-</i>	human	<i>-mab</i>
	<i>-vi(r)-</i>	viral	<i>-o-</i>	mouse	
	<i>-ba(c)-</i>	bacterial	<i>-a-</i>	rat	
	<i>-li(m)-</i>	immune	<i>-e-</i>	hamster	
	<i>-le(s)-</i>	infectious lesions	<i>-i-</i>	primate	
	<i>-ci(r)-</i>	cardiovascular	<i>-xi-</i>	chimeric	
	<i>-mu(l)-</i>	musculoskeletal	<i>-zu-</i>	humanized	
	<i>-ki(n)-</i>	interleukin	<i>-axo-</i>	rat/murine hybrid	
	<i>-co(l)-</i>	colonic tumor			
	<i>-me(l)-</i>	melanoma			
	<i>-ma(r)-</i>	mammary tumor			
	<i>-go(t)-</i>	testicular tumor			
	<i>-go(v)-</i>	ovarian tumor			
	<i>-pr(o)-</i>	prostate tumor			
	<i>-tu(m)-</i>	miscellaneous tumor			
<i>-neu(r)-</i>	nervous system				
<i>-tox(a)-</i>	toxin as target				

Tabella 44.A1 Anticorpi e immunoconiugati approvati per l'uso clinico.

Anticorpo	Bersaglio	Tipo	Indicazione terapeutica	Prima approvazione
Anticorpi "nudi"				
Rituximab	CD20	Chimerico	Linfoma non-Hodgkin	1997
Trastuzumab	HER2	Umanizzato	Carcinoma della mammella	1998
Alemtuzumab	CD52	Umanizzato	Leucemia linfocitica cronica	2001
Cetuximab	EGFR	Chimerico	Carcinoma coloretale	2004
Bevacizumab	VEGFA	Umanizzato	Carcinoma coloretale, glioblastoma, NSCLC, mRCC	2004
Panitumumab	EGFR	Umano	Carcinoma coloretale	2006
Ofatumumab	CD20	Umano	Leucemia linfocitica cronica	2009
Pertuzumab	HER2	Umanizzato	Carcinoma della mammella	2012
Ipilimumab	CTLA4	Umano	Melanoma metastatico	2012
Immunoconiugati				
⁹⁰Y-Ibritumomab tiuxetano	CD20	Murino	Linfoma	2002
Tositumomab e ¹³¹I-tositumomab	CD20	Murino	Linfoma	2003
Brentuximab vedotin	CD30	Chimerico	Linfoma di Hodgkin	2011
Trastuzumab-DM1 (trastuzumab-emtansina)	HER2	Umanizzato	Carcinoma della mammella	2013

Abbreviazioni: EGFR, *epidermal growth factor receptor*; HER2, *human epidermal growth factor receptor 2*; VEGF, *vascular endothelial growth factor*; CTLA4, *cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*; mRCC, carcinoma renale metastatico.

Tabella 44.A1 Anticorpi e immunoconiugati approvati per l'uso clinico.

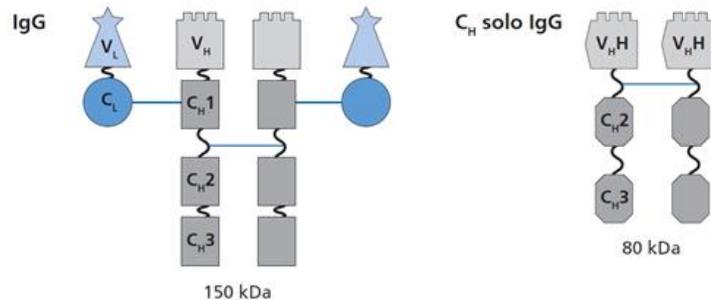
Tabella 44.2 Anticorpi monoclonali e inibitori catalitici a confronto.

	Anticorpi monoclonali	Inibitori catalitici a basso peso molecolare
Peso molecolare	~ 150 kDa	≤ 500 Da
Penetrazione nei tessuti	scarsa	buona
Permeabilità cellulare	molto scarsa	buona
Biodisponibilità orale	assente	buona
Metabolismo epatico	assente	elevato
Livelli plasmatici	bassa variabilità inter/intraindividuale	variabilità inter/intraindividuale elevata
Emivita plasmatica	1-3 settimane	1-2 giorni
Selettività per il bersaglio	assoluta	limitata

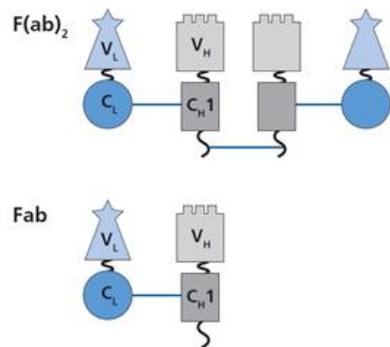
Tabella 44.2 Anticorpi monoclonali e inibitori catalitici a confronto.

Anticorpi naturali

Interi

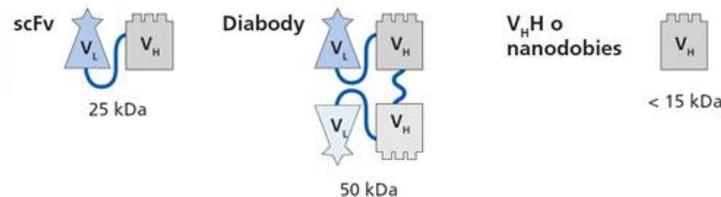


Frammenti anticorpali

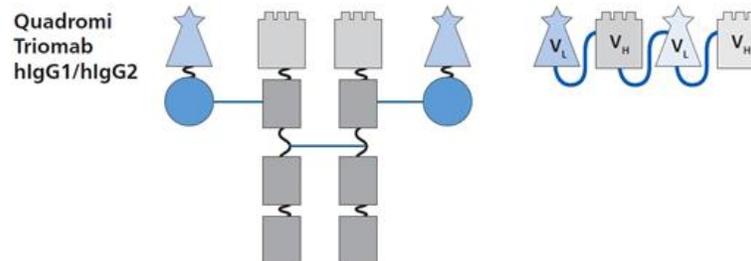


Anticorpi ingegnerizzati

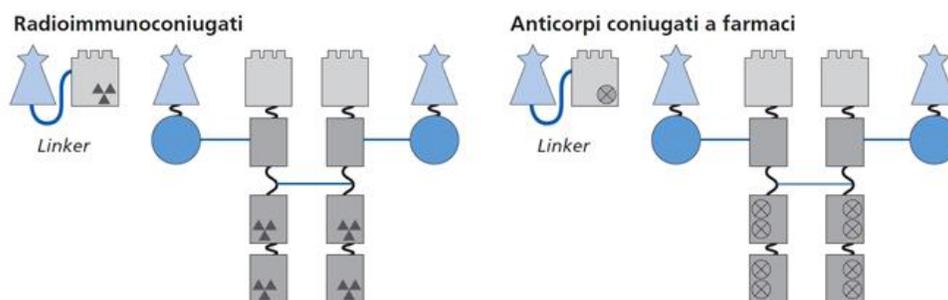
Frammenti anticorpali ricombinanti



Anticorpi bispecifici



Anticorpi coniugati a piccole molecole



Anticorpi coniugati a proteine

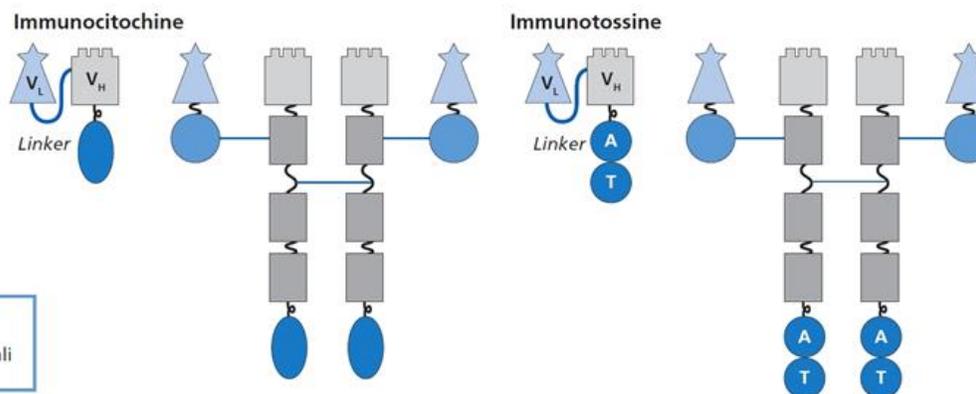
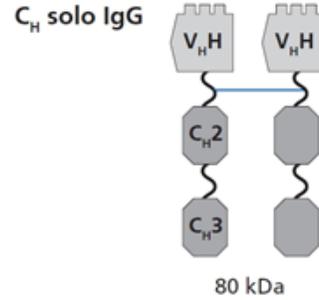
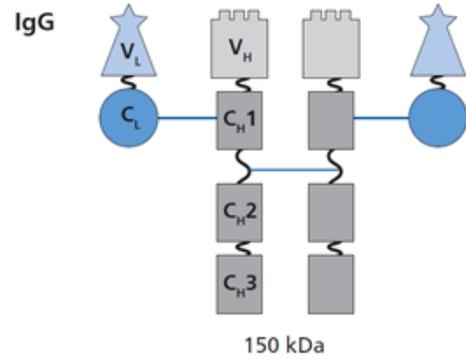


Figura 10.4 Struttura degli anticorpi e loro derivati d'impiego clinico. Gli anticorpi naturali comprendono molecole formate da catene intere, con struttura simile alle IgG classiche (due eterodimeri di catene L e H) o non convenzionali (omodimeri di catene H [C_H only IgG]), e dai frammenti anticorpali bivalenti (Fab₂) o monovalenti (Fab) ottenuti per proteolisi di IgG intere. Con l'ingegneria genetica si possono ottenere frammenti anticorpali ricombinanti come gli scFv, che sono eterodimeri di domini V uniti da un linker peptidico, e i monomeri del dominio V_H delle IgG non convenzionali, detti V_HH o nanobodies. L'unione di sequenze codificanti per catene intere o frammenti anticorpali derivati da anticorpi monoclonali diversi ha portato alla sintesi di anticorpi bispecifici, come i triomab (eterodimeri di un dimero H-L di topo e uno di ratto), i quadromi (anticorpi di topo derivati dalla fusione somatica di due ibridomi) e i prodotti di fusione fra isotipi di IgG umane, capaci di legare due antigeni diversi. Con l'intento di utilizzare gli anticorpi come strumenti di *delivery* di farmaci sono disponibili anticorpi interi o frammenti anticorpali coniugati a piccole molecole, radionuclidi o farmaci citotossici, o proteine ad attività biologica come tossine e citochine. Tutti i formati anticorpali, a eccezione degli anticorpi bispecifici, formano un legame monospecifico; il legame può essere bivalente, quando una molecola di anticorpo lega due molecole di antigene, o monovalente nel caso di anticorpi contenenti due soli domini variabili: HV-LV nei Fab, scFv e derivati, V_HH-V_HH o V_HH nelle IgG non convenzionali.

Anticorpi naturali

Interi



Frammenti anticorpali

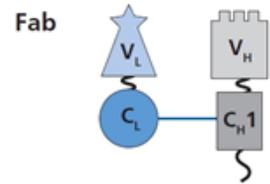
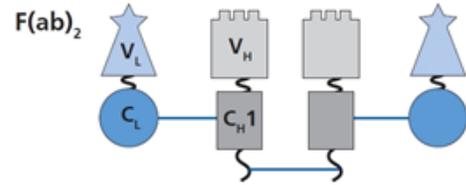


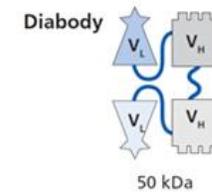
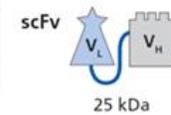
Figura 10.4 Struttura degli anticorpi e loro derivati d'impiego clinico. Gli anticorpi naturali comprendono molecole formate da catene intere, con struttura simile alle IgG classiche (due eterodimeri di catene L e H) o non convenzionali (omodimeri di catene H (C_H only IgG), e dai frammenti anticorpali bivalenti ($F(ab)_2$) o monovalenti (Fab) ottenuti per proteolisi di IgG intere. Con l'ingegneria genetica si possono ottenere frammenti anticorpali ricombinanti come gli scFv, che sono eterodimeri di domini V uniti da un *linker* peptidico, e i monomeri del dominio V_H delle IgG non convenzionali, detti V_{HH} o *nanobodies*. L'unione di sequenze codificanti per catene intere o frammenti anticorpali derivati da anticorpi monoclonali diversi ha portato alla sintesi di anticorpi bispecifici, come i triomab (eterodimeri di un dimero H-L di topo e uno di ratto), i quadromi (anticorpi di topo derivati dalla fusione somatica di due ibridomi) e i prodotti di fusione fra isotipi di IgG umane, capaci di legare due antigeni diversi. Con l'intento di utilizzare gli anticorpi come strumenti di *delivery* di farmaci sono disponibili anticorpi interi o frammenti anticorpali coniugati a piccole molecole, radionuclidi o farmaci citotossici, o proteine ad attività biologica come tossine e citochine. Tutti i formati anticorpali, a eccezione degli anticorpi bispecifici, formano un legame monospecifico; il legame può essere bivalente, quando una molecola di anticorpo lega due molecole di antigene, o monovalente nel caso di anticorpi contenenti due soli domini variabili: HV-LV nei Fab, scFv e derivati, V_{HH} - V_{HH} o V_{HH} nelle IgG non convenzionali.

Figura 10.4 Struttura degli anticorpi e loro derivati d'impiego clinico. Gli anticorpi naturali comprendono molecole formate da catene intere, con struttura simile alle IgG classiche (due eterodimeri di catene L e H) o non convenzionali (omodimeri di catene H (C_H only IgG)), e dai frammenti anticorpali bivalenti (Fab_2) o monovalenti (Fab) ottenuti per proteolisi di IgG intere. Con l'ingegneria genetica si possono ottenere frammenti anticorpali ricombinanti come gli scFv, che sono eterodimeri di domini V uniti da un *linker* peptidico, e i monomeri del dominio V_H delle IgG non convenzionali, detti V_H H o *nanobodies*. L'unione di sequenze codificanti per catene intere o frammenti anticorpali derivati da anticorpi monoclonali diversi ha portato alla sintesi di anticorpi bispecifici, come i triomab (eterodimeri di un dimero H-L di topo e uno di ratto), i quadromi (anticorpi di topo derivati dalla fusione somatica di due ibridomi) e i prodotti di fusione fra isotipi di IgG umane, capaci di legare due antigeni diversi. Con l'intento di utilizzare gli anticorpi come strumenti di *delivery* di farmaci sono disponibili anticorpi interi o frammenti anticorpali coniugati a piccole molecole, radionuclidi o farmaci citotossici, o proteine ad attività biologica come tossine e citochine. Tutti i formati anticorpali, a eccezione degli anticorpi bispecifici, formano un legame monospecifico; il legame può essere bivalente, quando una molecola di anticorpo lega due molecole di antigene, o monovalente nel caso di anticorpi contenenti due soli domini variabili: $HV-LV$ nei Fab , scFv e derivati, V_HH-V_HH o V_HH nelle IgG non convenzionali.

Anticorpi bispecifici - Queste molecole, più frequentemente utilizzate nel formato di frammenti anticorpali, hanno come **bersaglio l'antigene CD3**, una proteina di membrana che fa parte di un complesso macromolecolare costituente il recettore delle cellule TCR, T-Cell Receptor) **e un antigene tumorale** (per esempio. CD19 nei linfomi ed EGFR nei carcinomi). **Pertanto esse permettono di indirizzare la risposta citossica mediata da linfociti T, che esprimono CD3, verso le cellule tumorali che esprimono l'antigene.**

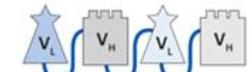
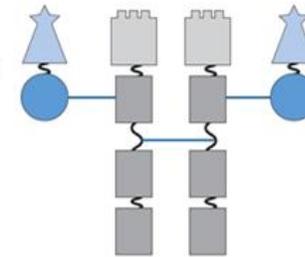
Anticorpi ingegnerizzati

Frammenti anticorpali ricombinanti



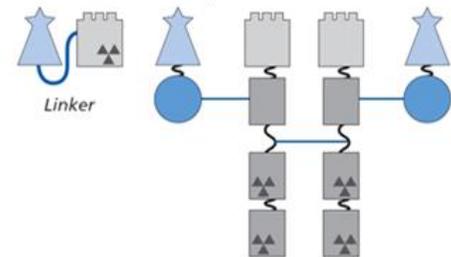
Anticorpi bispecifici

Quadromi
Triomab
hlgG1/hlgG2

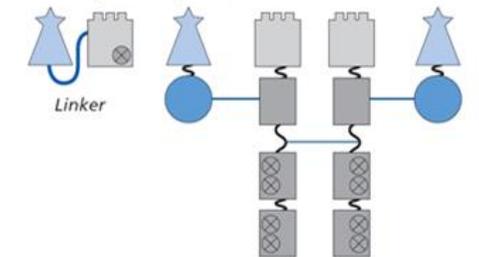


Anticorpi coniugati a piccole molecole

Radioimmunoconiugati

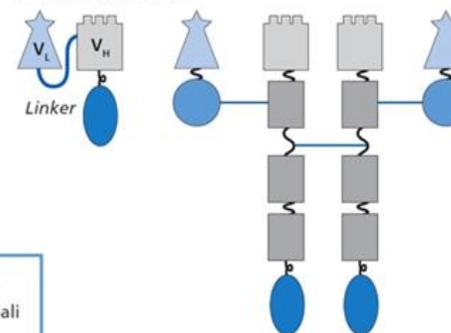


Anticorpi coniugati a farmaci

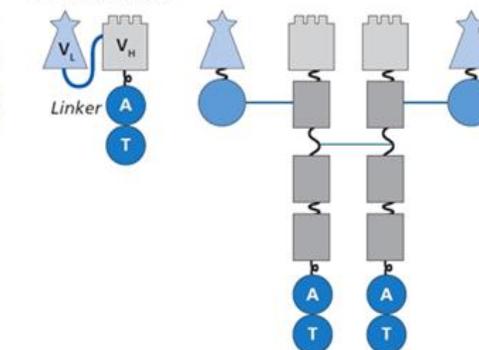


Anticorpi coniugati a proteine

Immunocitochine



Immunotossine



L'elenco dei diversi formati di anticorpi comprende:

- anticorpi interi; (a volte gli Ab interi sono anche detti nudi)
- frammenti anticorpali;
- anticorpi bispecifici;

- anticorpi coniugati a piccole molecole;
 - radioisotopi: radioimmunoconiugati (diagnostica: *imaging* oppure emissione particelle beta)
 - farmaci: gemtuzumab ozogamicina, diretto contro CD33, una proteina espressa in modo abnorme dalle cellule mieloidi tumorali (poi ritirato) anticorpo coniugato a 2-3 molecole di calicheamicina, un potente antitumorale.

- anticorpi coniugati a proteine;
 - a tossine** (tossiche per il bersaglio) o, al contrario, **a citochine** stimolanti il sistema immunitario nei pressi delle cellule che esprimono l'antigene

 - altre proteine (proteine di fusione: xxxx-**cept**) vedi esempi slide seguente

- anticorpi intracellulari

Un esempio di questa classe di farmaci è l'**Etanercept**, il prodotto di fusione Fc-recettore approvato in clinica, per il trattamento dell'artrite reumatoide.

E' un prodotto di **fusione tra il dominio Fc di un'igG1 umana con il dominio extracellulare del recettore di tipo 2** per il TNFalfa.

Il recettore del TNF- α tipo 2 è implicato nell'attivazione di un effettore, il fattore nucleare-kB (NF-kB) che ha il compito di attivare la trascrizione di geni che codificano per proteine proinfiammatorie. In ultima analisi, quindi, l'attivazione del recettore di tipo 2 per il TNFalfa ha funzione proinfiammatoria.

Tramite questo dominio, etanercept lega TNFalfa e sottrae questa citochina dal legame con il recettore di membrana, impedendo la sua attività biologica.

Altri esempi sono l'**Abatacept** e il **Belatacept** utilizzati per bloccare l'attività dei linfociti T nella terapia immunosoppressiva.

Un altro esempio di rilievo è l'**Aflibercept**, una proteina di fusione contenente il dominio extracellulare del recettore del VEGF, utilizzato nel trattamento della degenerazione maculare e in alcuni tumori. Sequestrato dall'interazione con questa molecola "trappola/esca" (*decoy*) il VEGF non lega il proprio recettore di membrana, sfavorendo l'effetto che questo fattore di crescita esercita nel sostenere le forme patologiche menzionate (degenerazione maculare e in alcuni tumori)

Ecco una lista di anticorpi monoclonali approvati per uso clinico, con nome commerciale e relativo ambito d'uso:

Abciximab (ReoPro): malattie cardiovascolari

Adalimumab (Humira): malattie autoimmuni

Alemtuzumab (Campah): leucemia cronica linfocitica

Basiliximab (Simulect): rigetto da trapianto

Belimumab (Benlysta): lupus eritematoso sistemico

Bevacizumab (Avastin): tumore del colon-retto, tumore mammario metastatico, tumore polmonare a piccole cellule, tumore renale avanzato/metastatico

Cetuximab (Erbix): tumore del colon-retto, tumori del distretto testa-collo

Certolizumab (Cimzia): malattia di Crohn, artrite reumatoide

Denosumab (Xgeva): tumore con metastasi ossee

Eculizumab (Soliris): emoglobinuria parossistica notturna

Golimumab (Simponi): malattie reumatiche (artrite reumatoide, spondilite anchilosante, artrite psoriasica)

Ibritumomab tiuxetan (Zevalin): linfoma non-Hodgkin

Infliximab (Remicade): malattie autoimmuni (spondilite anchilosante, colite ulcerosa, artrite reumatoide, morbo di Crohn, artrite psoriasica)

Ipilimumab (Yervoy): melanoma

Muromonab CD3 (Orthoclone OKT3): rigetto da trapianto

Natalizumab (Tysabri): sclerosi multipla, malattia di Crohn

Nivolumab (Opdivo): cancro al polmone

Ofatumumab (Arzerra): leucemia linfatica cronica

Omalizumab (Xolair): malattie allergiche, asma

Pavilizumab (Synagis): virus respiratorio sinciziale (RSV)

Panitumumab (Vectibix): tumore del colon-retto

Ranibizumab (Lucentis): degenerazione maculare

Rituximab (Rituxan): linfoma non-Hodgkin

Tositumomab (Bexxar): linfoma non-Hodgkin

Trastuzumab (Herceptin): cancro al seno

STRUTTURA DI UN ANTICORPO

