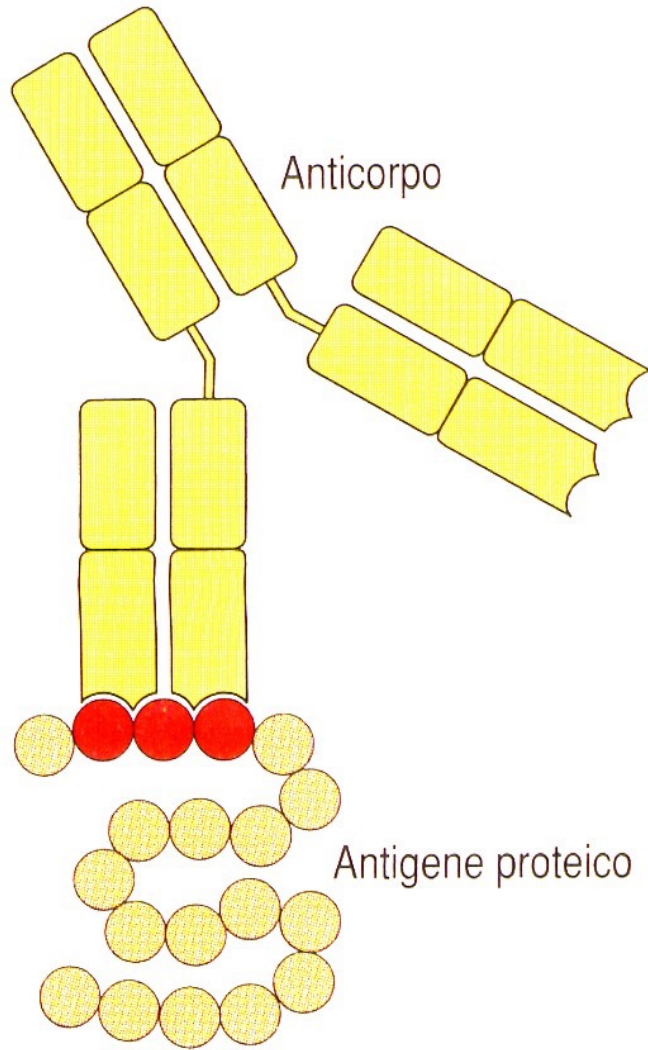
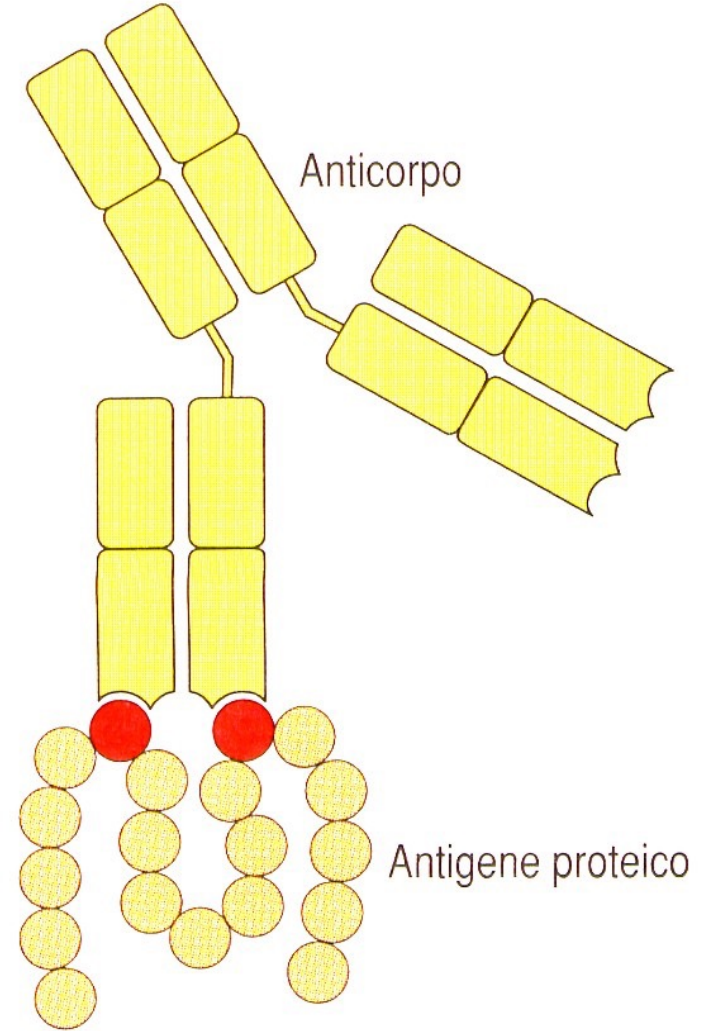


GLI ANTICORPI MONOCLONALI

Epitopo lineare



Epitopo discontinuo



Ciascun linfocita B possiede un UNICO tipo di recettore (BCR) e può produrre anticorpi aventi tutti la STESSA SPECIFICITA'.

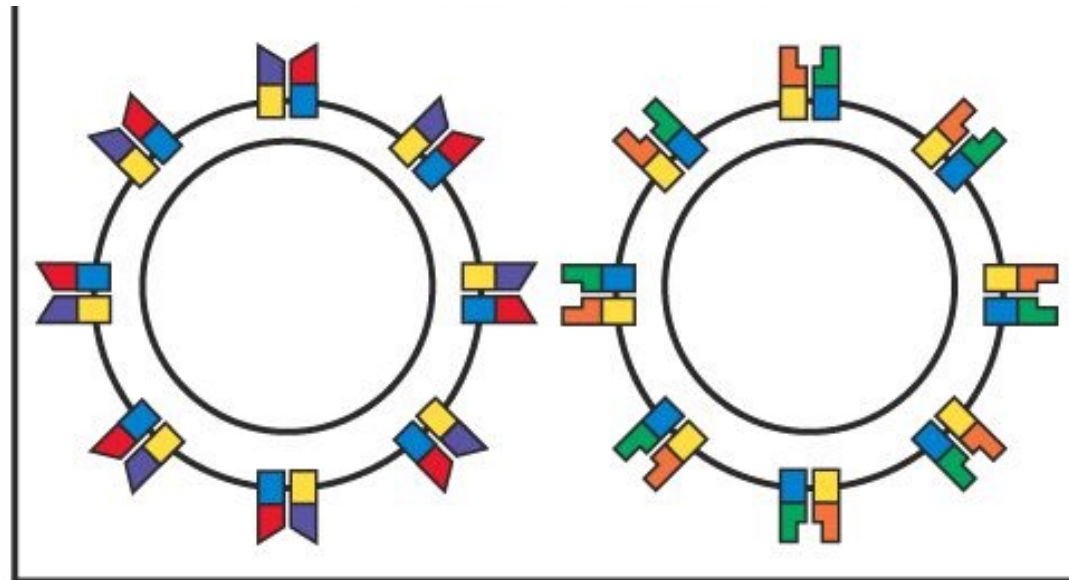


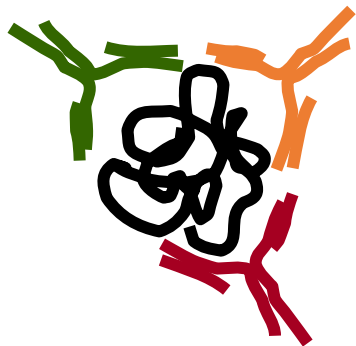
Figure 1-18 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science

Anticorpi

Policlonali

Anticorpi ottenuti da sieri di animali esposti ad un antigene. Derivano da più cellule B.

Riconoscono più di un epitopo antigenico dello stesso antigene



Monoclonali

Derivano da una singola cellula B.

Riconoscono un singolo epitopo antigenico

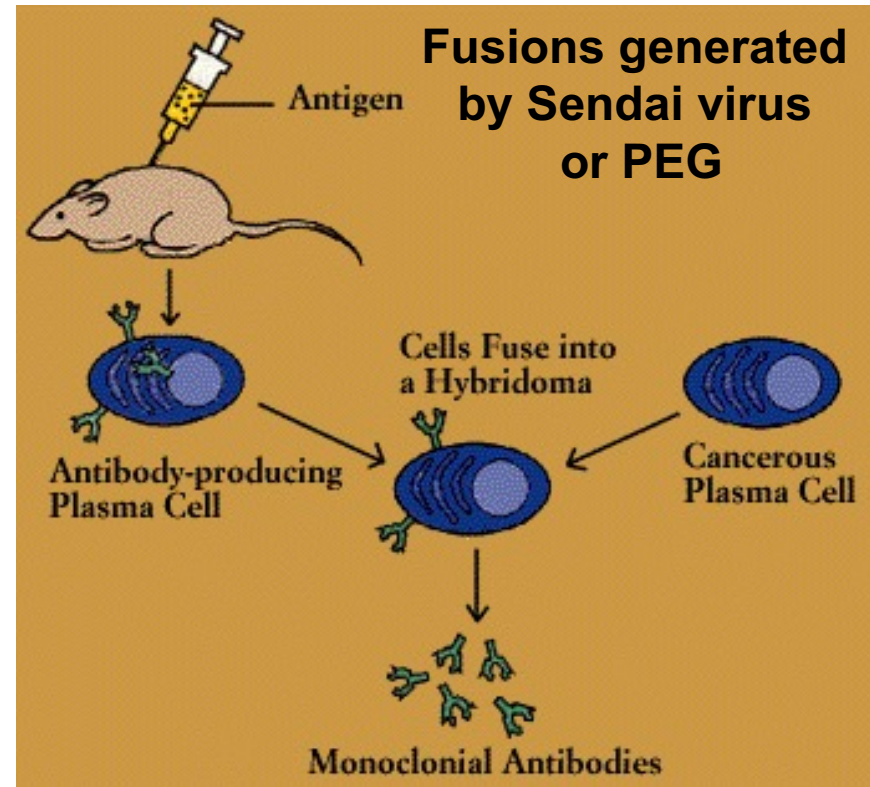


Definizione di ANTICORPI

MONOCLONALI: molecole anticorpali prodotte da un singolo clone di linfociti B e quindi identiche per quel che riguarda la loro specificità antigenica.

Hybridoma

1975 Kohler and Milstein



Nobel Prize in Physiology or Medicine 1984



PRODUCTION OF MONOCLONAL Abs

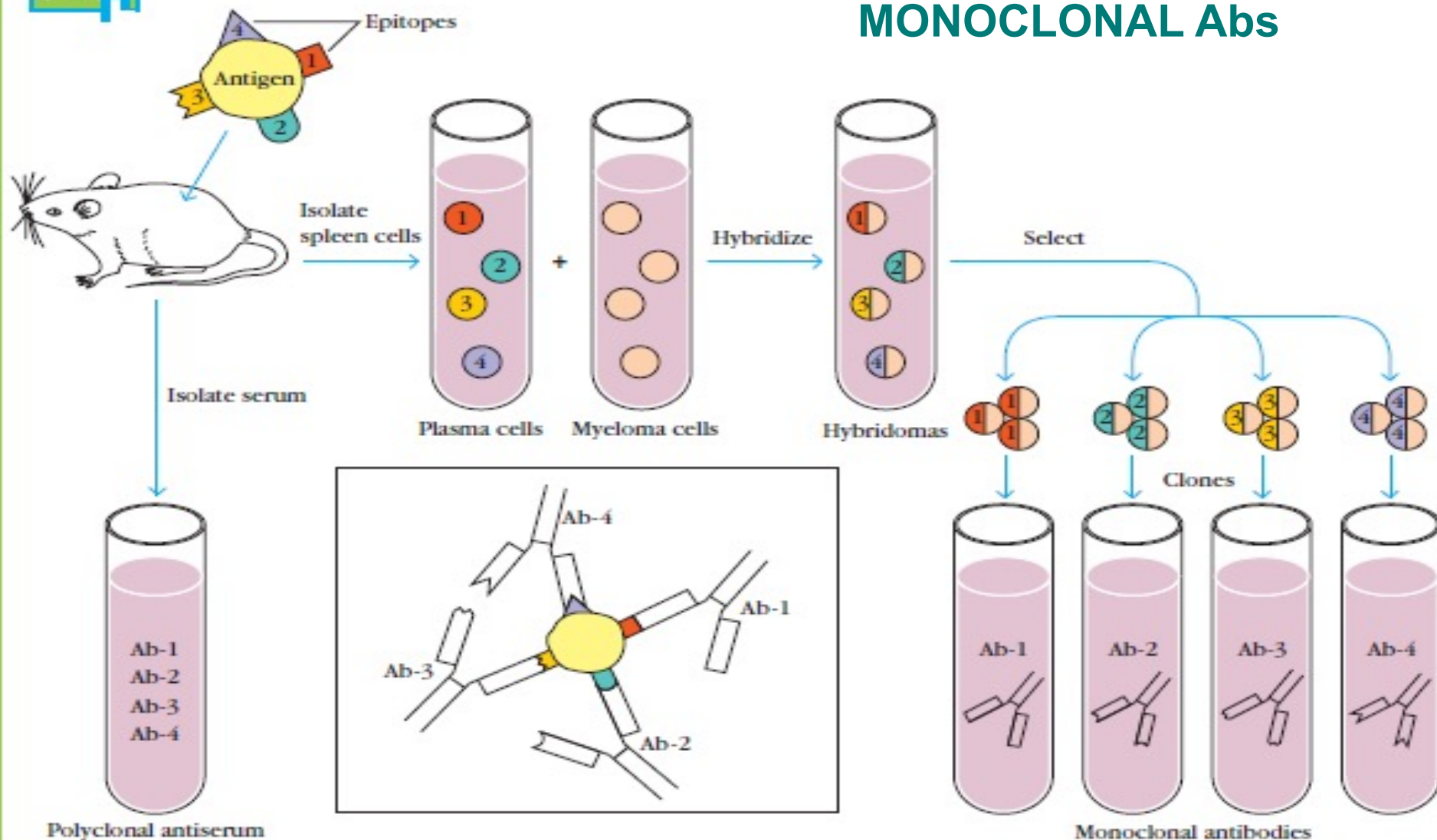


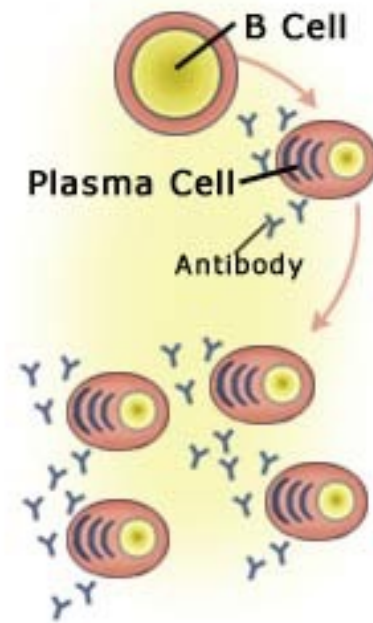
FIGURE 4-21 The conventional polyclonal antiserum produced in response to a complex antigen contains a mixture of monoclonal antibodies, each specific for one of the four epitopes shown on the antigen (inset). In contrast, a monoclonal antibody,

which is derived from a single plasma cell, is specific for one epitope on a complex antigen. The outline of the basic method for obtaining a monoclonal antibody is illustrated here.

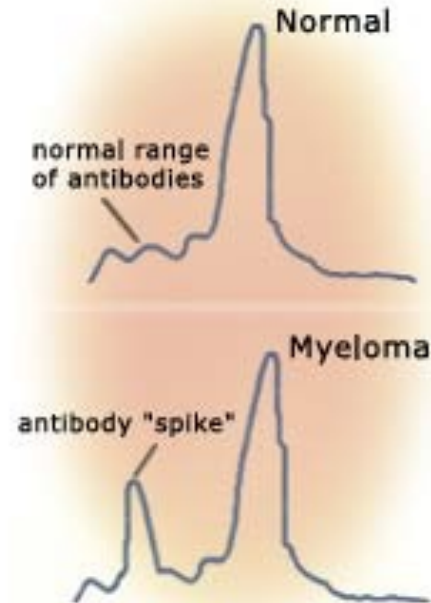
Anticorpi monoclonali: uno strumento essenziale, le cellule di MIELOMA

Mieloma: tumore originante dalla proliferazione di una singola cellula secernente anticorpi

Monoclonal
Immunoglobulins



Gel Electrophoresis

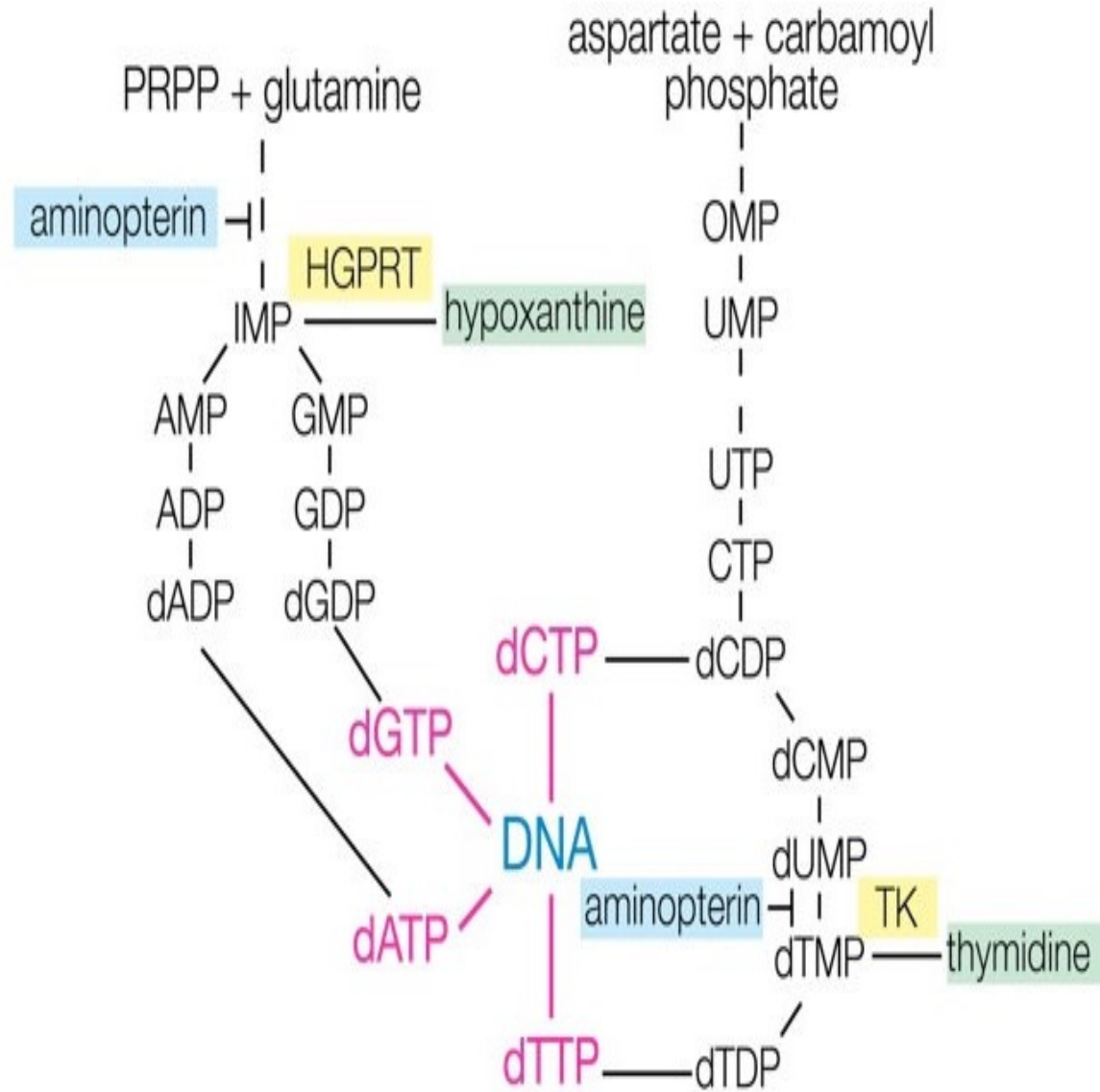


Bence Jones proteins in urine of multiple myeloma patients

Cellule di mieloma rese adatte per l'ottenimento di ibridomi

Cellule di mieloma: il mieloma è un tumore delle cellule B e di per sé è in grado di produrre anticorpi tuttavia per semplificare sono state selezionate cellule di mieloma che **hanno perso la capacità di produrre anticorpi**. Queste cellule inoltre **mancano** dell'enzima ipoxantina-guanina-fosforibosil trasferasi (**HGPRT**) necessario per la sintesi delle basi puriniche a partire da ipoxantina, **o** della timidin chinasi (**TK**) necessaria alla sintesi della base pirimidinica dTTP a partire dalla timidina, quando il pathway di sintesi principale è bloccato dalla droga aminopterina.

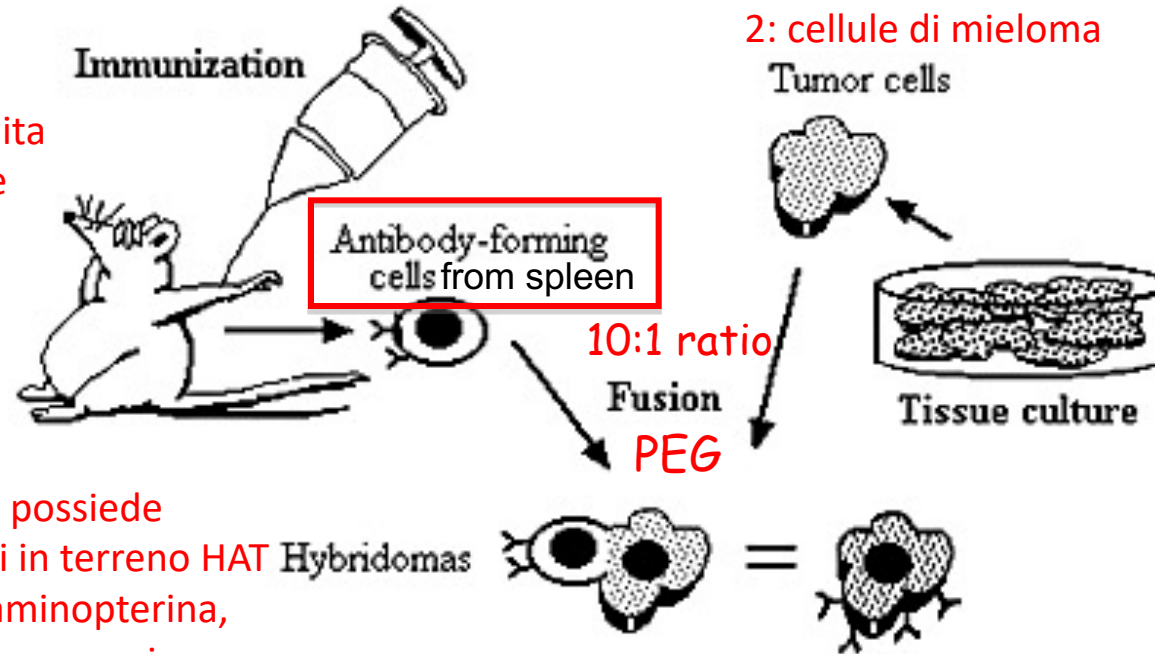
Pathways
involved in
nucleotide
synthesis in
mammalian
cells



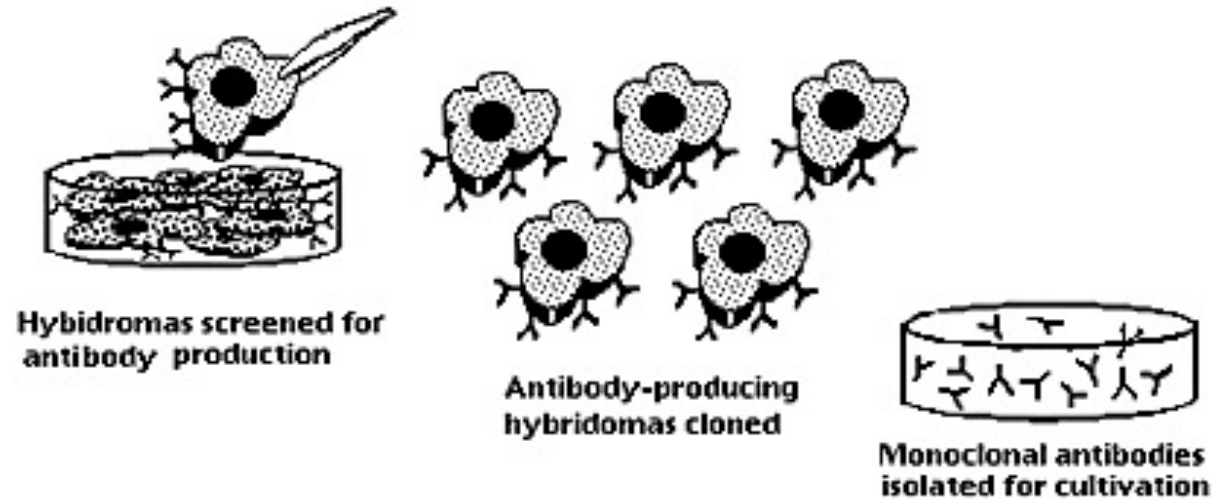
PRPP: phosphoribosyl pyrophosphate; HGPRT: hypoxanthine-guanine phosphorybosyl transferase; TK: thymidin kinase.

- Le cellule di mieloma HGPRT – (negative): sono **cellule immortali** ma non possono sopravvivere in un terreno di selezione HAT: Hypoxantine, Aminopterin, Thymidine.
- Le cellule B **sono cellule mortali** ma nel terreno HAT sopravvivono perché, pur avendo il pathway principale della sintesi degli acidi nucleici bloccato dalla aminopterina, posseggono la HGPRT.
- **Le cellule di ibridoma sopravvivono in terreno HAT perché acquisiscono l'immortalità delle cellule di mieloma e l'enzima HGPRT delle cellule B.**

1: una prima dose iniettata sottocute con adiuvante, seguita dopo 4 settimane da una dose intravenosa senza adiuvante

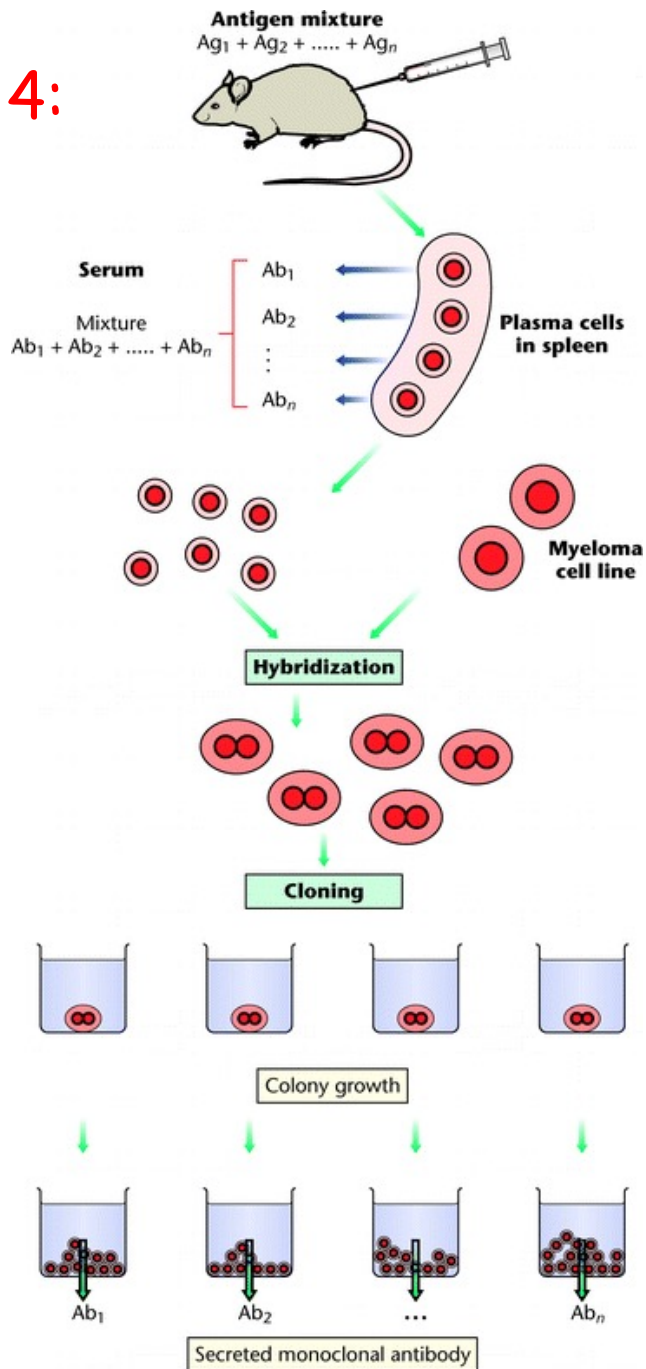


3: l' ibridoma possiede HGPRT quindi in terreno HAT (ipoxantina, aminopterina, timidina) può sopravvivere.



Monoclonal Antibody Production

4:



4: le cellule B vengono mescolate con le cellule mielomatose, centrifugate e risospese in un piccolo volume contenente l' agente fusogeno PEG. La fusione avviene in pochi minuti ed in modo casuale sicchè si formano cellule polinucleate; fra queste vi sono alcuni IBRIDOMI derivati dalla fusione fra una cellula B ed una di mieloma. Quando l' ibridoma entra in mitosi, i nuclei si fondono dando origine ad una cellula mononucleata inizialmente tetraploide (poi molti cromosomi vengono persi). Le cellule vengono dunque distribuite in piastre per coltura ed incubate a 37° C. Si aggiunge il terreno di selezione HAT per uccidere le cellule mielomatose non fuse (oppure fuse tra loro). I linfociti e le plasmacellule non fuse (o fuse tra loro) muoiono entro pochi giorni a causa della loro ridotta capacità di crescere in coltura. Le sole cellule che cresceranno in terreno HAT saranno gli ibridomi. Dopo 7-14 giorni le colonie di ibridomi diventano visibili. L' operazione successiva è la cosiddetta "diluizione al limite": le cellule vengono contate e distribuite in piastre con pozzetti in modo da avere meno di una cellula per pozzetto. Ciascuna di queste cellule produce un anticorpo con idiotipo differente dalle altre. Il supernatante di ciascun pozzetto conterrà l' anticorpo monoclonale pronto per essere testato.

CONSIDERAZIONI SULLA PREPARAZIONE DEGLI IBRIDOMI

E' facile che qualcosa vada storto! Sono **frequenti le contaminazioni da muffe o lieviti**: per questo motivo conviene procedere con il congelamento non appena si è trovata una colonia (di almeno alcuni milioni di cellule) produttore un buon anticorpo.

La quantità di lavoro richiesta per la messa a punto di un ibridoma è considerevole: dall' inizio fino al momento in cui gli anticorpi sono testati trascorrono circa 150 gg.

Il prodotto finale è UNICO e non è possibile ottenerlo identico attraverso una nuova preparazione di ibridoma. Per questo motivo è fondamentale realizzare una “banca” di ibridomi congelati.

Gli ibridomi possono essere mantenuti in coltura per un tempo indefinito, “splittando” le colture ogni 2-3 gg e mantenendo le cellule ad una densità compresa nel range 10^5 - 10^6 (in piastra petri da 10 cm).

In genere tuttavia si preferisce tenere in coltura gli ibridomi solo il tempo necessario ad avere un anticorpo fresco, dopo di che si procede con il congelamento.

Resa in termini di quantità di anticorpo:

- 1-60 $\mu\text{g/ml}$ da un supernatante di una fiasca.
- Se è necessaria una quantità superiore:
 - a) L'ibridoma è inoculato nella cavità peritoneale di un topo dopo può crescere. Con questo approccio si arriva ad una resa di 1-5 mg/ml. Procedura poco accettata per questioni etiche e perché nel liquido ascitico si possono trovare anche anticorpi diversi non prodotti dall'ibridoma.
 - a) Uso di fermentatori: permettono di ottenere quantità da pochi milligrammi a grammi (per uso clinico).

Antisieri policlonali vs. Anticorpi monoclonali

Contengono una molteplicità di anticorpi contro una molteplicità di epitopi antigenici.	Si tratta di singoli anticorpi specifici per singoli epitopi antigenici.
Frequentemente danno cross-reattività nei confronti di antigeni scorrelati.	Raramente danno cross-reattività.
Poco riproducibili: Es: due antisieri di coniglio contro il medesimo antigene possono essere molto diversi fra loro (per specificità, affinità....).	La specificità di un anticorpo monoclonale non varia.

APPLICAZIONI DEGLI Ac MONOCLONALI

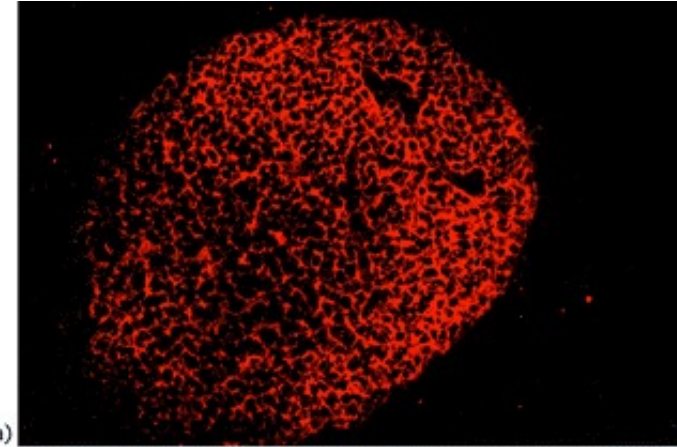
1. APPLICAZIONI

ANALITICHE: nella ricerca di base (es. immunolocalizzazione di proteine in cellule o tessuti); per la individuazione di antigeni batterici o virali (es. proteina Spike di Sars-Cov2).

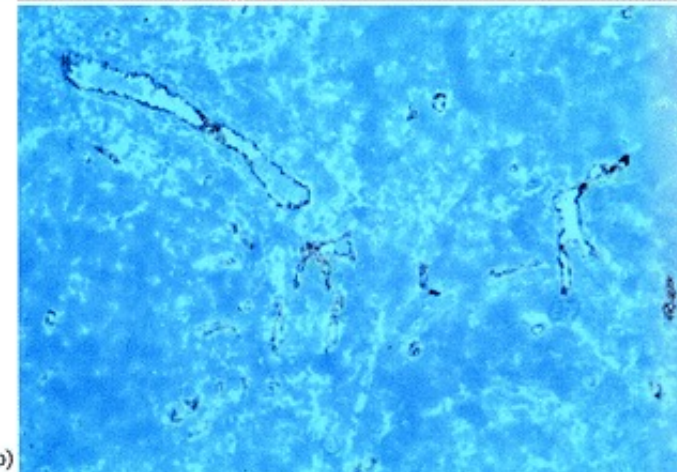
Per la
diagnosi di
gravidanza



Linfonodo colorato con Ac anti CD19,
proteina espressa sui linfociti B



(a)

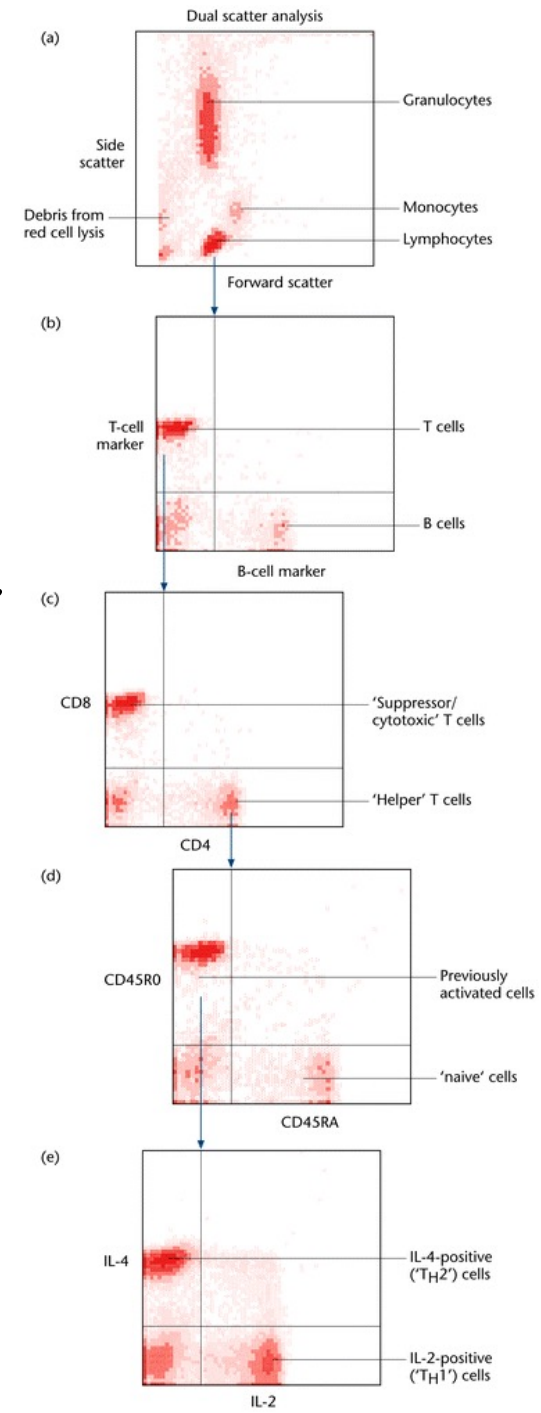


(b)

Tessuto linfoide colorato con Ac anti E-
selectina, proteina dell' endotelio

Anticorpi monoclonali coniugati a fluorofori possono servire per identificare una sottopopolazione di cellule del sangue (mediante il FACS*).

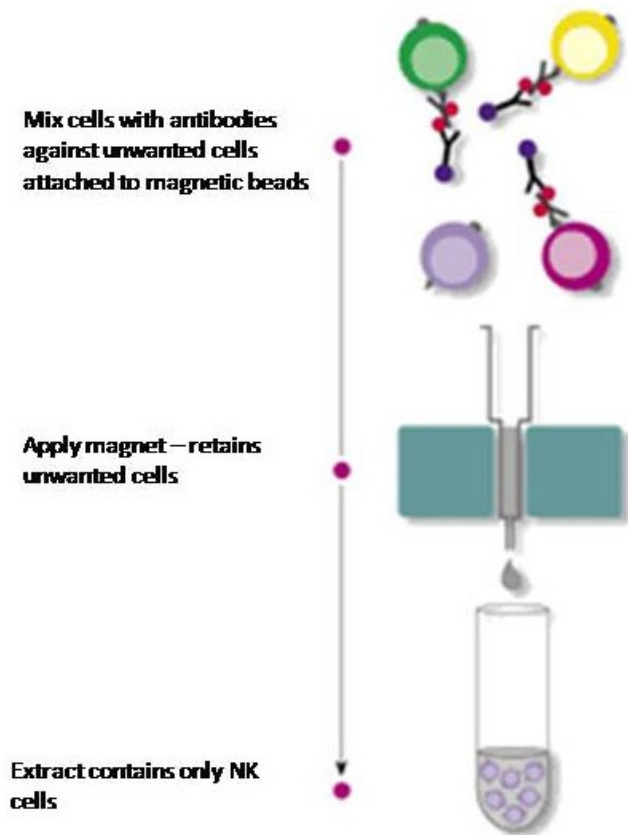
* FACS=Fluorescence Activated Cell Sorting



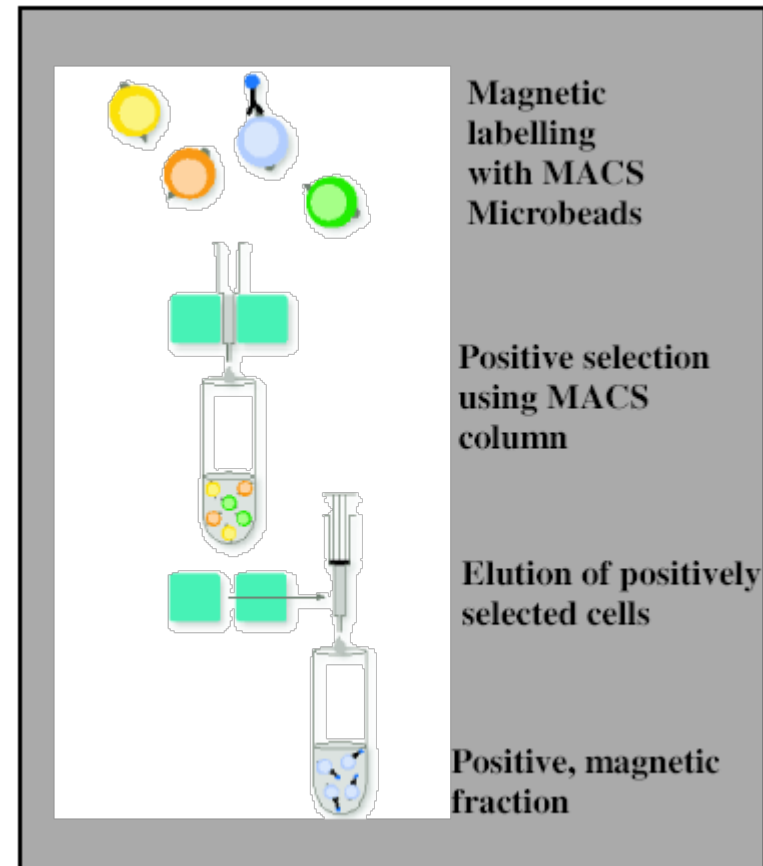
Come funziona il FACS

Vedi tutorial su Moodle del corso

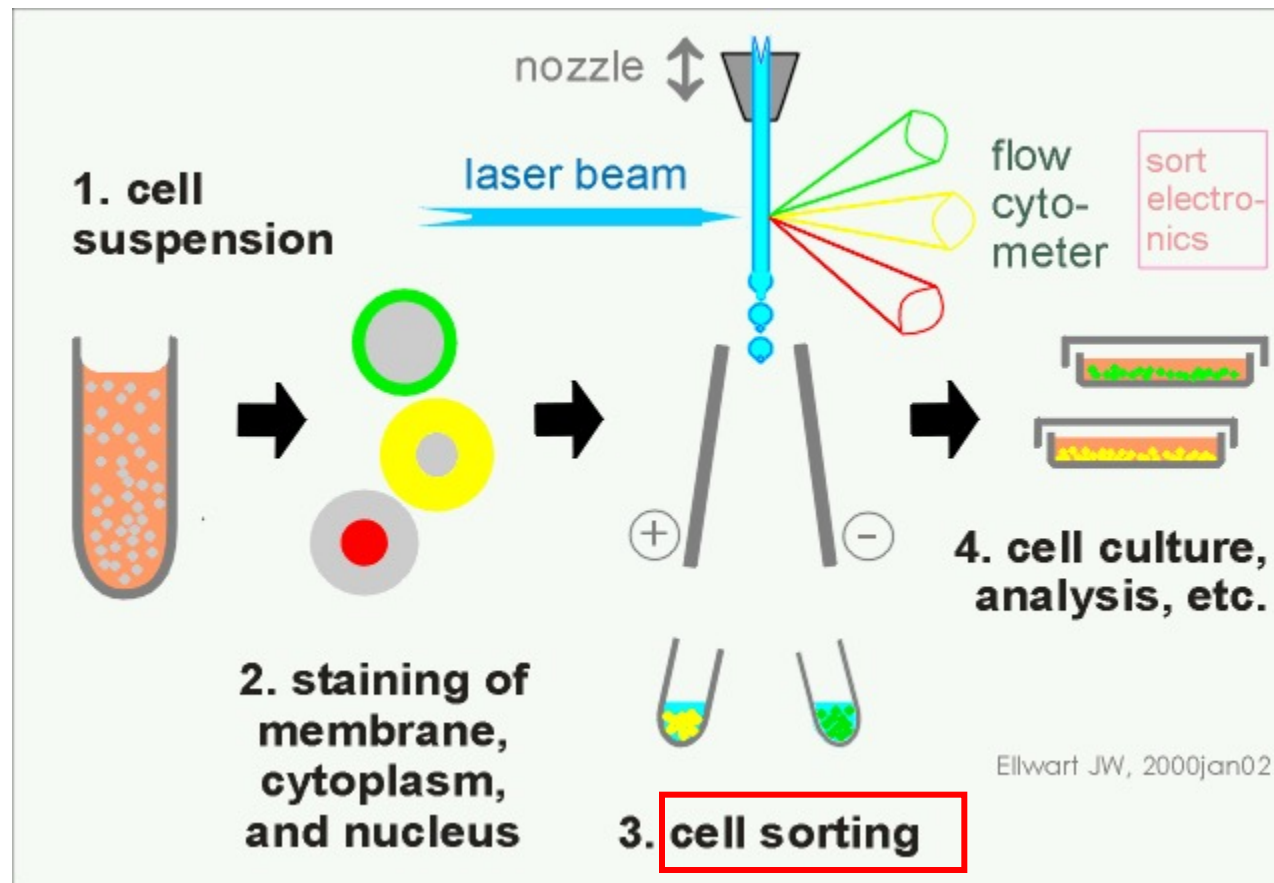
Negative selection



Positive selection

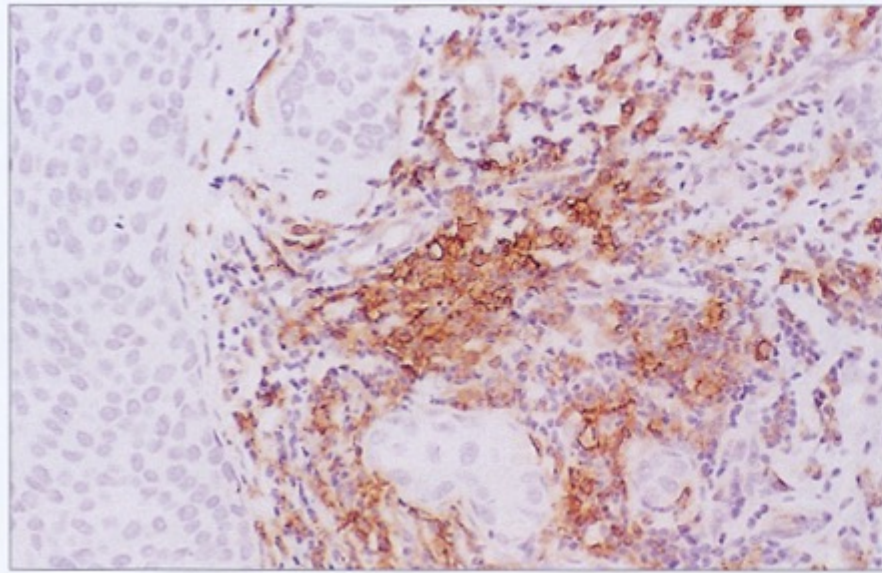


2. APPLICAZIONI PREPARATIVE: anticorpi possono essere usati per purificare molecole o cellule da estratti; numerose aziende hanno messo a punto kit per purificare cellule da estratti “attaccando” l’ anticorpo monoclonale a biglie magnetiche.

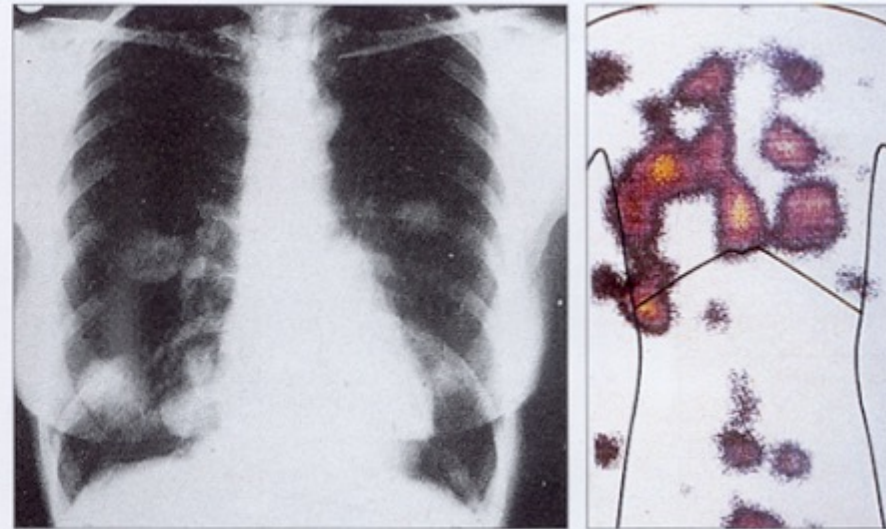


Anticorpi monoclonali coniugati a fluorofori possono servire per purificare una sottopopolazione cellulare (mediante cell sorter).

in vitro (IHC)



in vivo



^{99m}Tc -mAb*

3. APPLICAZIONI DIAGNOSTICHE: Anticorpi monoclonali possono essere usati per: i) tumor detection in vitro (pannello a sinistra) mediante immunoistochimica (IHC) utilizzando mAb coniugati a perossidasi; ii) per tumor detection in vivo (pannello a destra), utilizzando mAb coniugati a radioisotopi.

*metastabile nuclear isomer of technetium-99

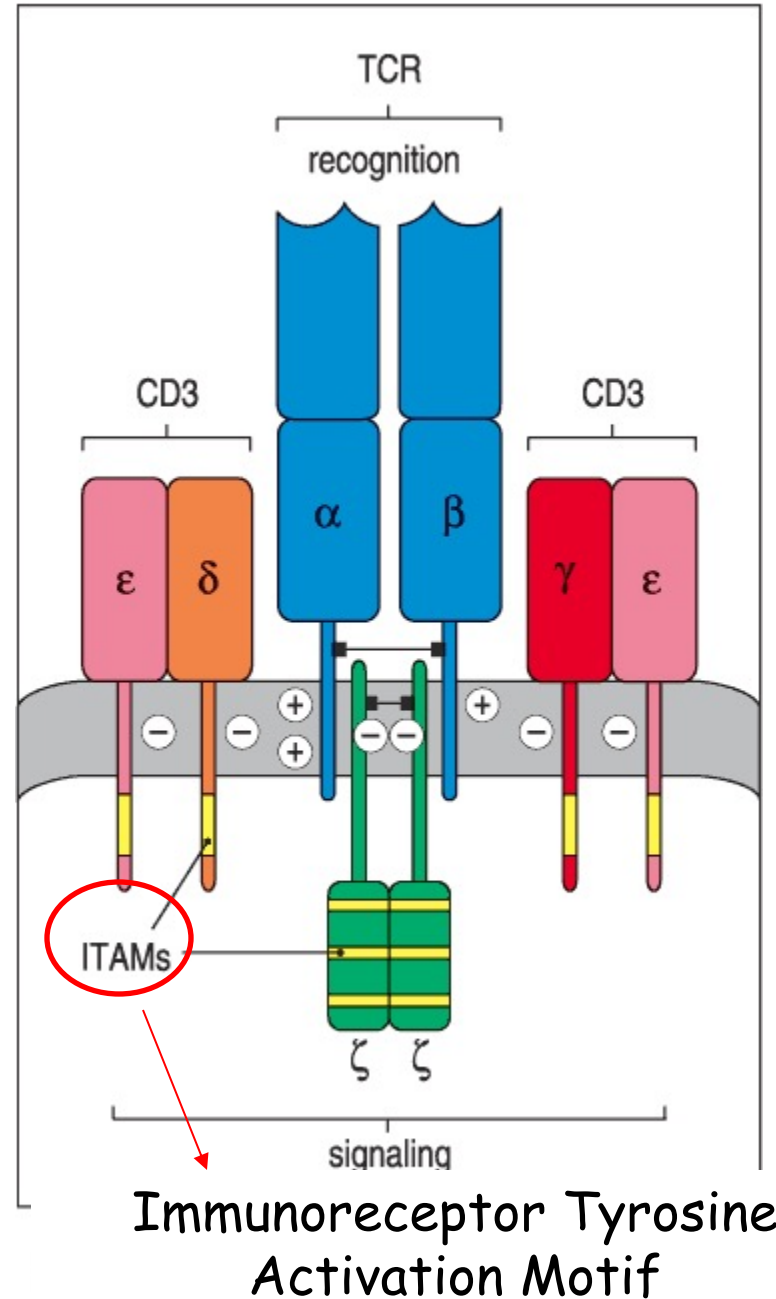
4. APPLICAZIONI TERAPEUTICHE: i targets clinici degli anticorpi monoclonali sono in genere molecole secrete (es. citochine) o porzioni extracellulari di proteine trans-membrana (es. recettori di fattori di crescita e molecole di adesione).

Primo anticorpo monoclonale approvato dalla FDA (1986): OKT3 contro la molecola CD3 (co-recettore del TCR) è stato usato per prevenire il rigetto dei trapianti.

Il TCR è sempre associato con un complesso chiamato CD3 costituito da 4 peptidi non variabili, γ, δ, ϵ e ζ (zeta).

Queste molecole sono coinvolte nel signalling all'interno della cellula T quando questa lega antigene + MHC.

TCR + CD3 prende il nome di:
COMPLESSO DEL TCR



Meccanismo d'azione degli anticorpi monoclonali

1. Possono legarsi a recettori di fattori di crescita esercitando un effetto diretto sulla crescita e la proliferazione cellulare: non legando i fattori di crescita la cellula va in apoptosi.
2. Possono legare antigeni di superficie ed avviare direttamente un segnale di apoptosi (es anticorpi anti death receptors, TNF-R e FAS).

3. Neutralizzando targets come citochine (es. TNF- α).
4. Marcando cellule per la loro distruzione da parte di altre cellule (i.e. macrofagi, cellule NK) o da parte del sistema del complemento
5. Targettando tossine o altre molecole biologicamente attive, ad essi legate, a bersagli cellulari.

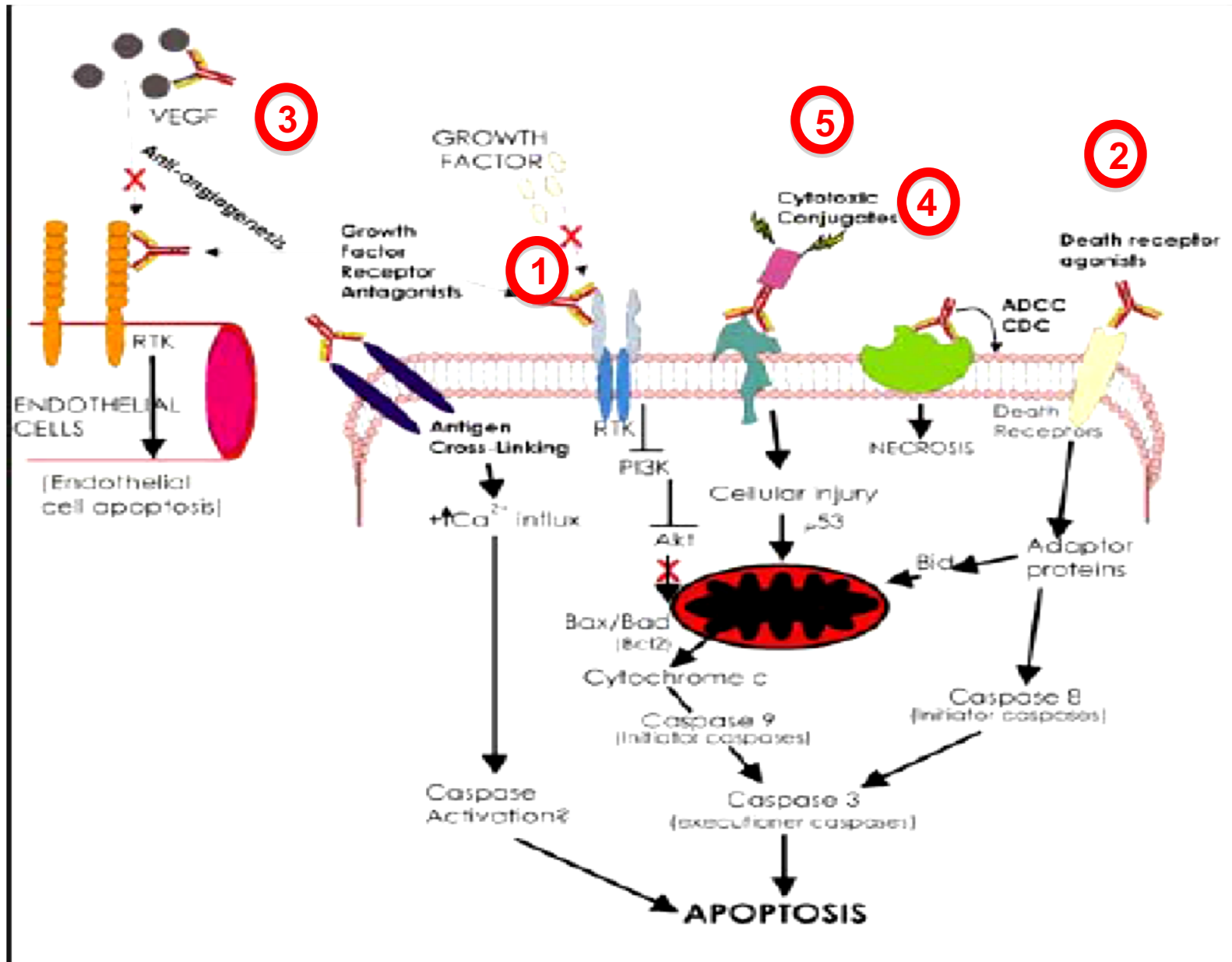


Table 4. Best Selling Monoclonal Antibodies 2004-2006

Current Medicinal Chemistry, 2007, 14, 1978-1987

Generic Name Target	Brand FDA Approval	Companies	Indication	Sales \$ billion		
				2004	2005	2006
Rituximab c CD20	Rituxan 1997	Roche	Leukemia, Lymphoma, RA	2.8	3.2	4.7
Infliximab c TNF α	Remicade 1998	J&J	CD, UC, AS RA, Ps, PsA	2.1	3.5	4.2
Trastuzumab hz HER2	Herceptin 1998	Roche	Breast Cancer	1.3	1.65	3.14
Bevacizumab VEGF hz	Avastin 2004	Roche	Colon cancer Lung cancer	0.55	1.3	2.4
Adalimumab h TNF α	Humira 2002	Abbott	RA, PsA, AS, CD	0.85	1.4	2.04
Cetuximab c EGFR	Erbix 2004	Bristol Myers Squibb Merck KgA	Colon Cancer HNC	0.26	0.94	1.1
Palivizumab hz RSV	Synagis 1998	MedImmune, Astra Zeneca	RSV	0.95	1.1	1.1
Omalizumab hz IgE	Xolair 2003	Roche, Novartis	Allergic Asthma	0.19	0.36	0.52
Ranibizumab hz VEGF	Lucentis 2006	Novartis, Roche	Macular Degeneration			0.38
Abciximab c CD3	ReoPro 1994	J&J, Lilly	Thrombosis Inhibitor	0.36	0.30	0.28
Natalizumab, hz α 4 Integrin	Tysabri 2004/2006	Biogen Idec, Elan	Multiple Sclerosis			0.06
Panitumumab h EGFR	Vectibix 2006	Amgen	Colon Cancer			0.04

Commercially successful antibodies are listed in Table. Rituxan with its \$4.7 billion sales was the best selling biological product in 2006.

In 2007, total global monoclonal antibody sales reached \$26 billion and in 2012, global sales of antibody-based therapeutic products exceeded \$50 billion.

Top 10 best-selling monoclonal antibody drugs in 2018

No.	Drug	Indication (1st US FDA Approval Year)	Company	2018 Revenue (USD)
1	Adalimumab (Humira)	Rheumatoid arthritis (2002) Psoriatic arthritis (2005) Ankylosing spondylitis (2006) Juvenile Idiopathic Arthritis (2008) Psoriasis (2008) Crohn's disease (2010) Ulcerative colitis (2012) Hidradenitis suppurativa (2015) Uveitis (2018)	AbbVie	\$19.9 bn
2	Nivolumab (Opdivo)	Melanoma (2015) Non-small cell lung cancer (2015) Renal cell carcinoma (2015) Head and neck squamous cell (2016)	Bristol-Myers Squibb	\$7.6 bn
3	Pembrolizumab (Keytruda)	Melanoma (2014) Head and neck cancer (2016) Non-small cell lung cancer (2015) Lymphoma (2018) Cervical cancer (2018) Microsatellite instability-high cancer (2018)	Merck & Co	\$7.2 bn
4	Trastuzumab (Herceptin)	Breast cancer (1998) Gastric cancer (2010)	Roche	\$7.0 bn
5	Bevacizumab (Avastin)	Colorectal cancer (2004) Non-small cell lung cancer (2006) Breast ERB2 negative cancer (2008) Renal cell carcinoma (2009) Glioblastoma (2011)	Roche	\$6.8 bn
6	Rituximab, (Rituxan)	Non-Hodgkin's lymphoma (1997) Chronic lymphocytic leukemia (2010) Rheumatoid arthritis (2006) Pemphigus vulgaris (2018)	Roche	\$6.8 bn
7	Infliximab (Remicade)	Crohn's Disease (1998) Rheumatoid arthritis (1999) Ankylosing spondylitis (2004) Ulcerative colitis (2005) Psoriatic arthritis (2005) Psoriasis (2006)	Johnson & Johnson	\$5.9 bn
8	Ustekinumab (Stelara)	Psoriasis (2009) Psoriatic arthritis (2013) Crohn's Disease (2016)	Johnson & Johnson	\$5.2 bn
9	Eculizumab (Soliris)	Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (2007) Atypical hemolytic uremic syndrome (2011) Generalized myasthenia gravis (2017) Neuromyelitis optica spectrum disorder (2019)	Alexion	\$3.6 bn
10	Omalizumab (Xolair)	Asthma (2003) Chronic idiopathic urticaria (2014)	Roche	\$3.0 bn

bn, billion

Evolution of Therapeutic Monoclonal Antibodies

