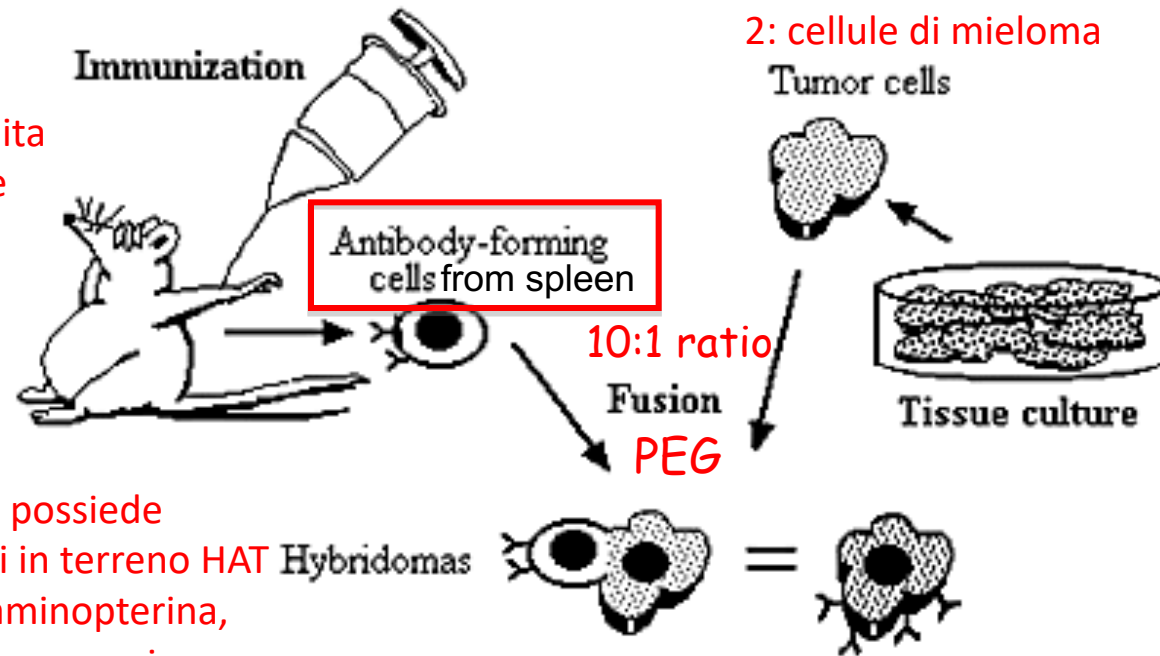
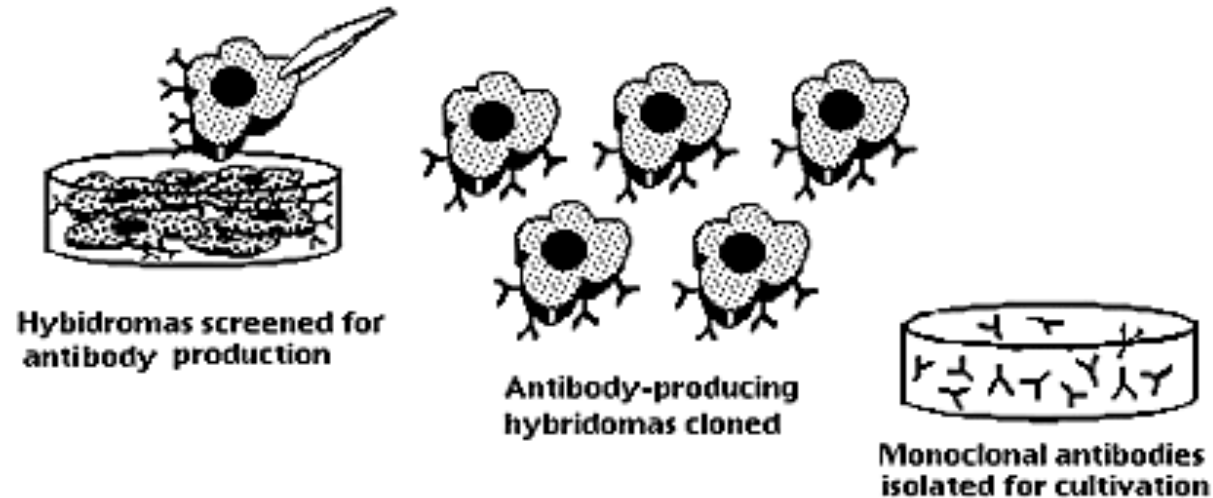


1: una prima dose iniettata sottocute con adiuvante, seguita dopo 4 settimane da una dose intravenosa senza adiuvante

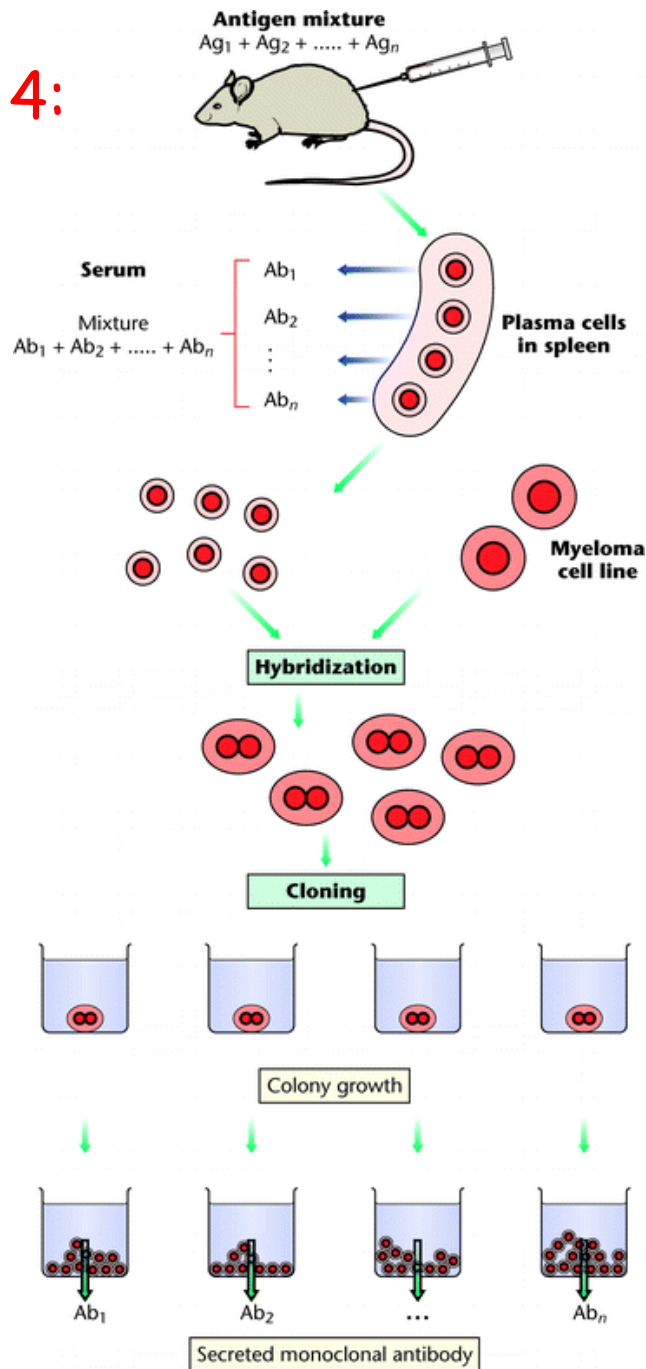


3: l' ibridoma possiede HGPRT quindi in terreno HAT (ipoxantina, aminopterina, timidina) può sopravvivere.



Monoclonal Antibody Production

4:



- Fusione cellulare: cellule B + cellule mielomatose → trattate con PEG → fusione casuale → formazione di cellule polinucleate, alcune = ibridomi (B + mieloma).
- Formazione dell'ibridoma: durante la mitosi i nuclei si fondono → cellula mononucleata tetraploide, che perde parte dei cromosomi.
- Coltura e selezione: le cellule sono distribuite in piastre, incubate a 37°C e trattate con terreno HAT → muoiono cellule non fuse, sopravvivono solo gli ibridomi.
- Crescita: dopo 7–14 giorni compaiono colonie di ibridomi.
- Diluizione al limite: distribuzione di **<1 cellula per pozzetto** → ogni cellula produce un anticorpo con idiotipo specifico.
- Raccolta: il supernatante dei pozzetti contiene l'anticorpo monoclonale, pronto per test e caratterizzazione.

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, 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:

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.

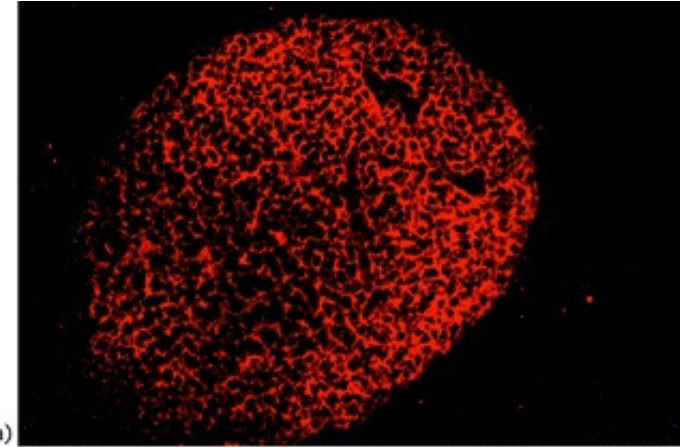
APPLICAZIONI DEGLI Ac MONOCLONALI

1. APPLICAZIONI ANALITICHE

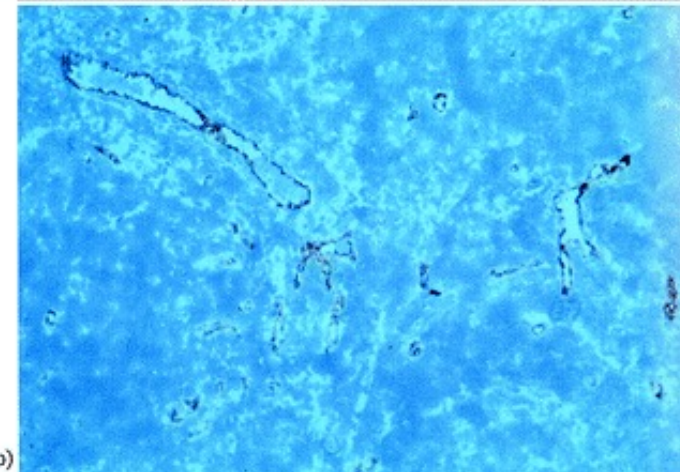
- ❑ nella ricerca di base (es. immunolocalizzazione di proteine in cellule o tessuti)
- ❑ Per la diagnosi di gravidanza; per la individuazione di antigeni batterici o virali (es. proteina Spike di Sars-Cov2)



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



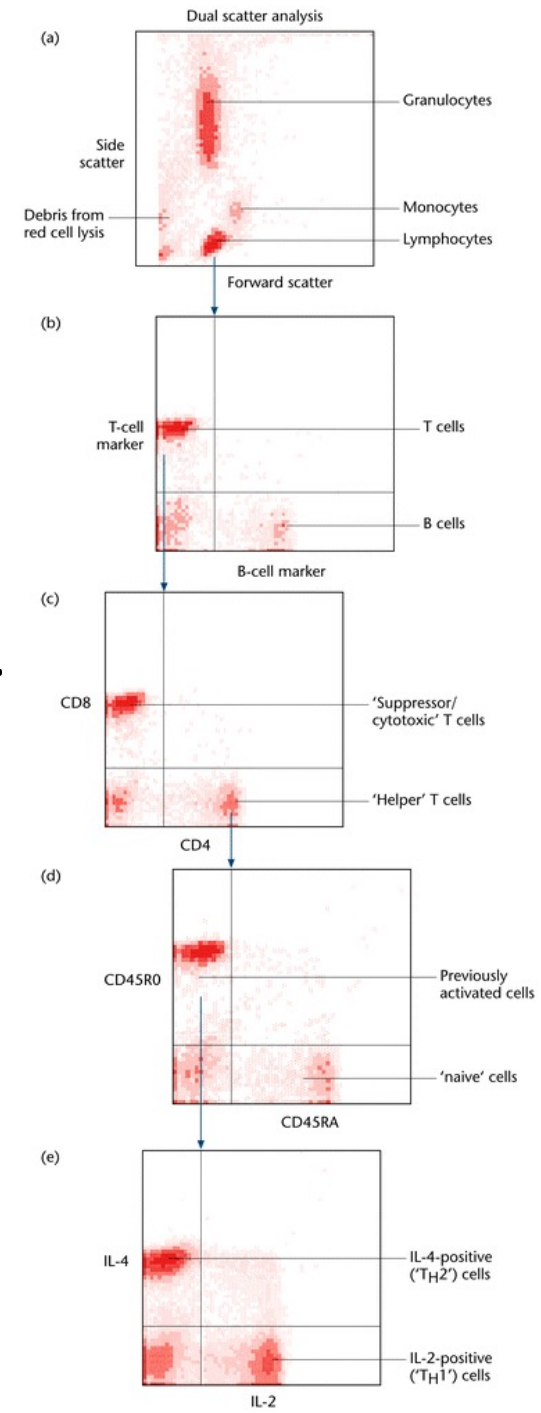
(a)



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*).

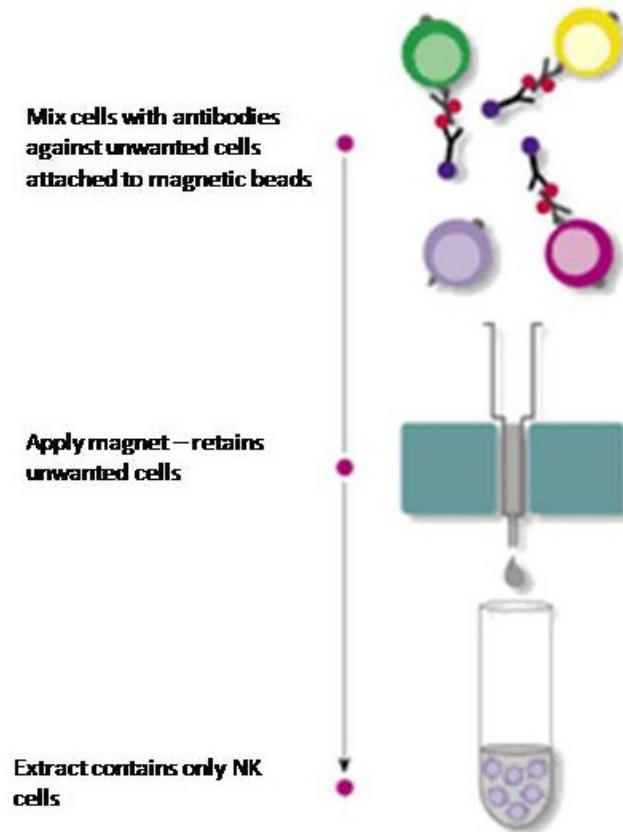
* FACS=Fluorescence Activated Cell Sorting



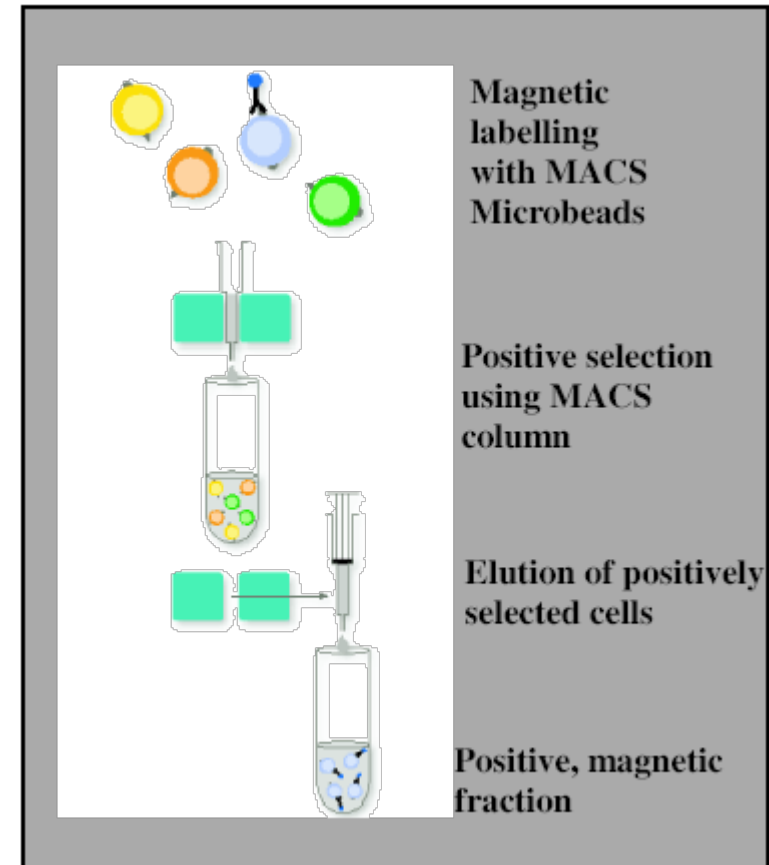
Come funziona il FACS

Vedi tutorial su Moodle del corso

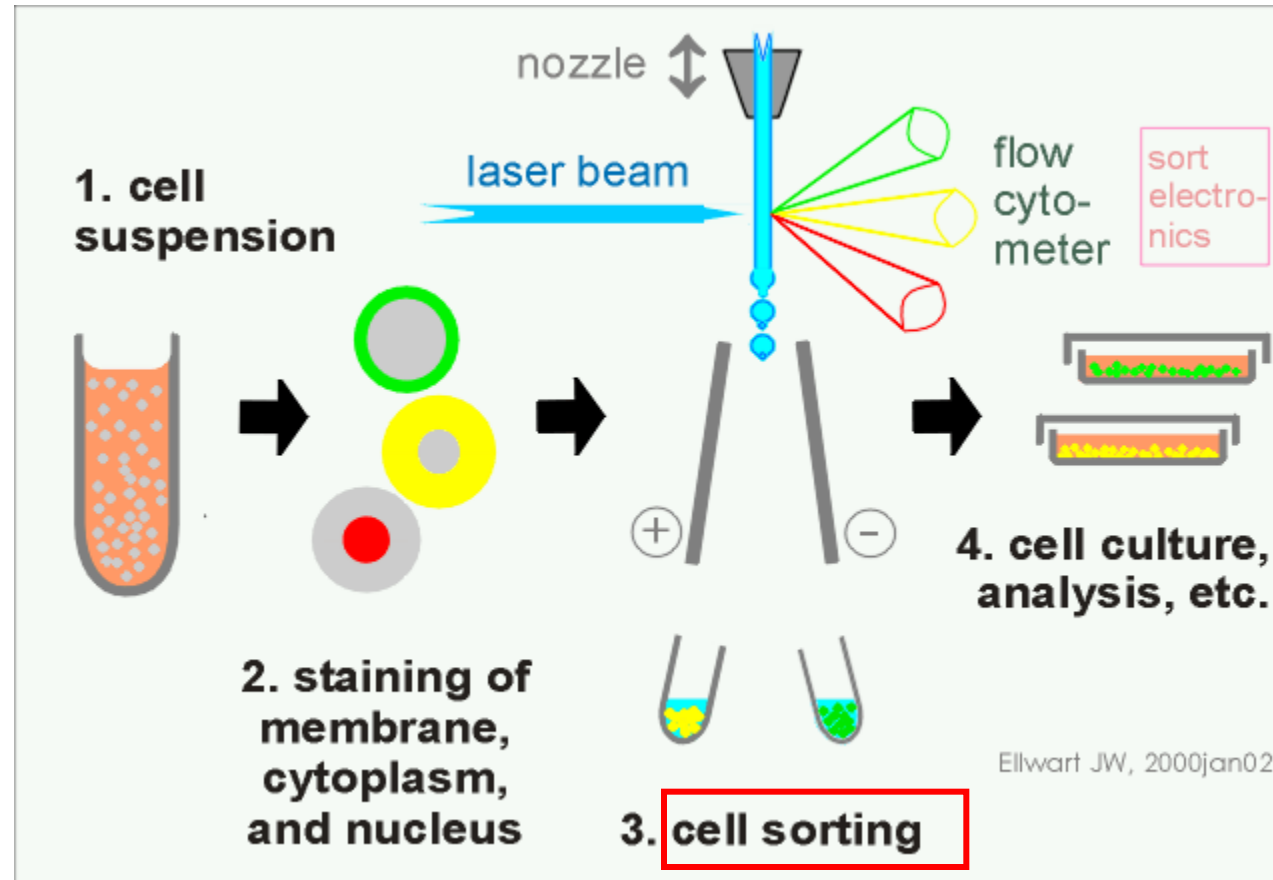
Negative selection



Positive selection

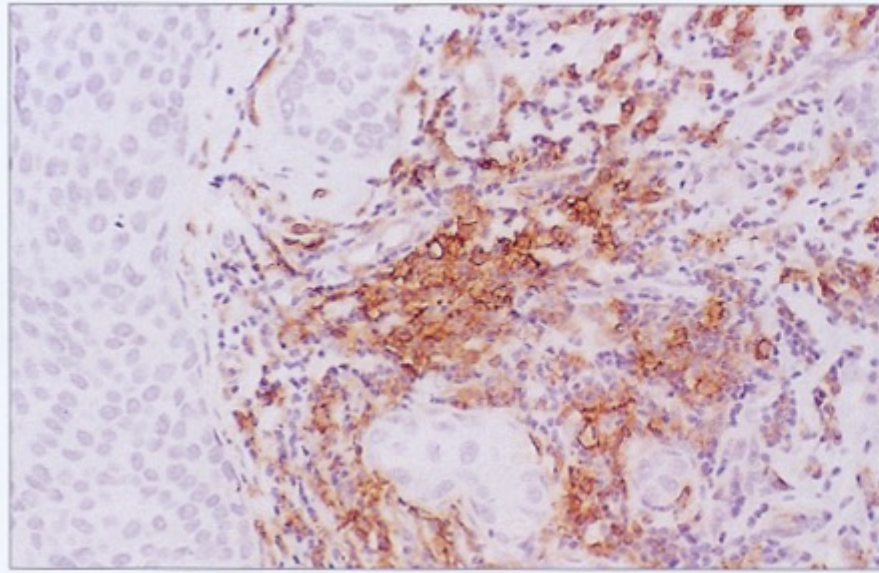


2. APPLICAZIONI PREPARATIVE: anticorpi possono essere usati per purificare molecole o cellule; numerose aziende hanno messo a punto kit per purificare cellule specifiche da popolazioni miste attaccando anticorpi monoclonali specifici per marcatori identificativi di cellule specifiche, a biglie magnetiche.

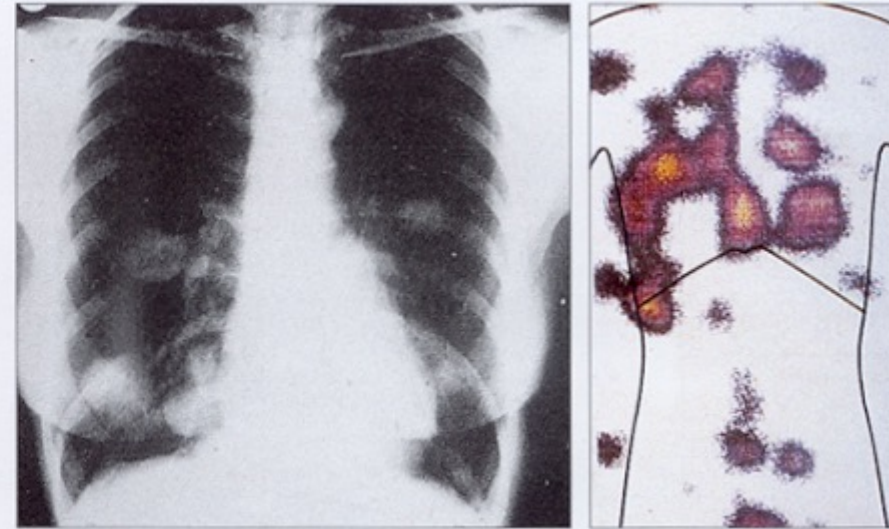


Anticorpi monoclonali coniugati a fluorofori possono servire per purificare una sottopopolazione cellulare (mediante cell sorter).

in vitro (IHC)



in vivo



^{99m}Tc -mAb*

3. APPLICAZIONI DIAGNOSTICHE: Anticorpi monoclonali possono essere usati per:

- ☐ tumor detection *in vitro* (pannello a sinistra) mediante immunoistochimica (IHC) utilizzando mAb coniugati a perossidasi;
- ☐ tumor detection *in vivo* (pannello a destra), utilizzando mAb coniugati a radioisotopi.

*metastable nuclear isomer of technetium-99

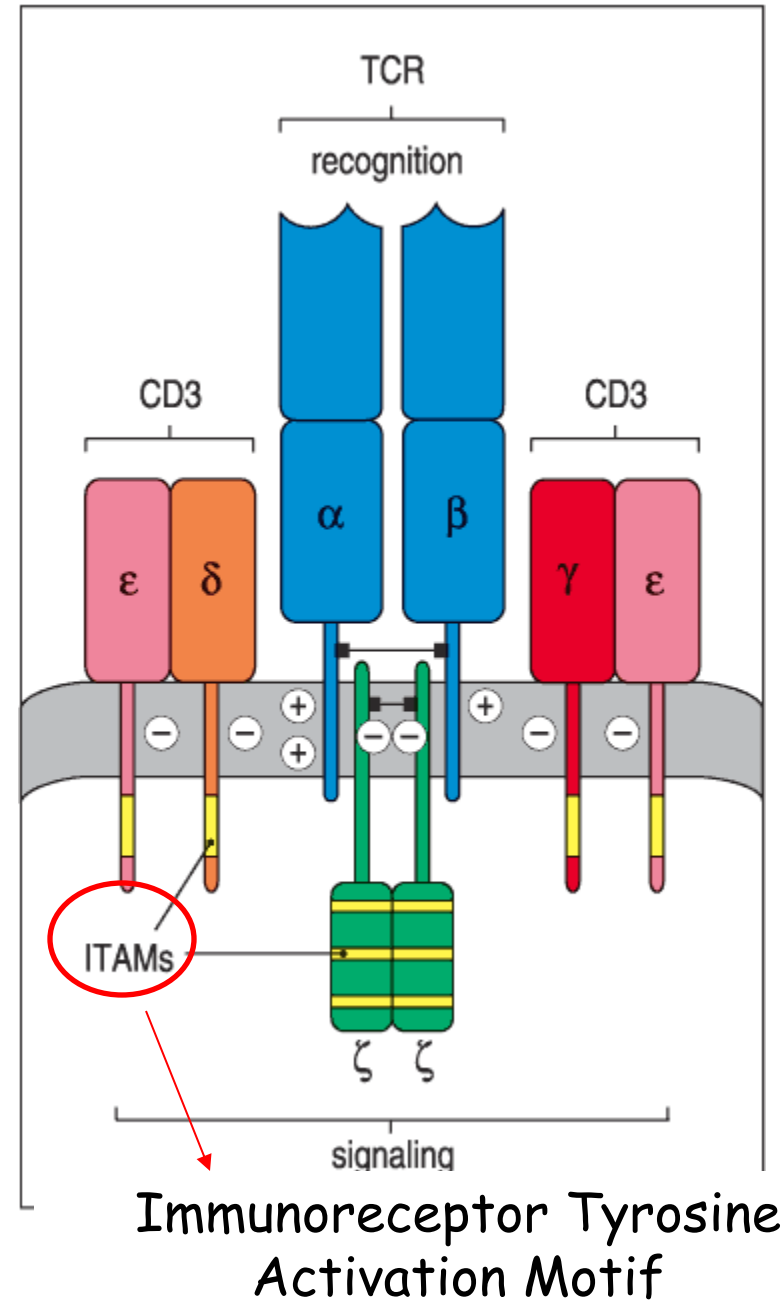
4. APPLICAZIONI TERAPEUTICHE: i targets clinici degli anticorpi monoclonali sono in genere **molecole secrete** (es. citochine) o **porzioni extracellulari di proteine trans-membrana** (es. recettori di fattori di crescita e molecole di adesione).

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.

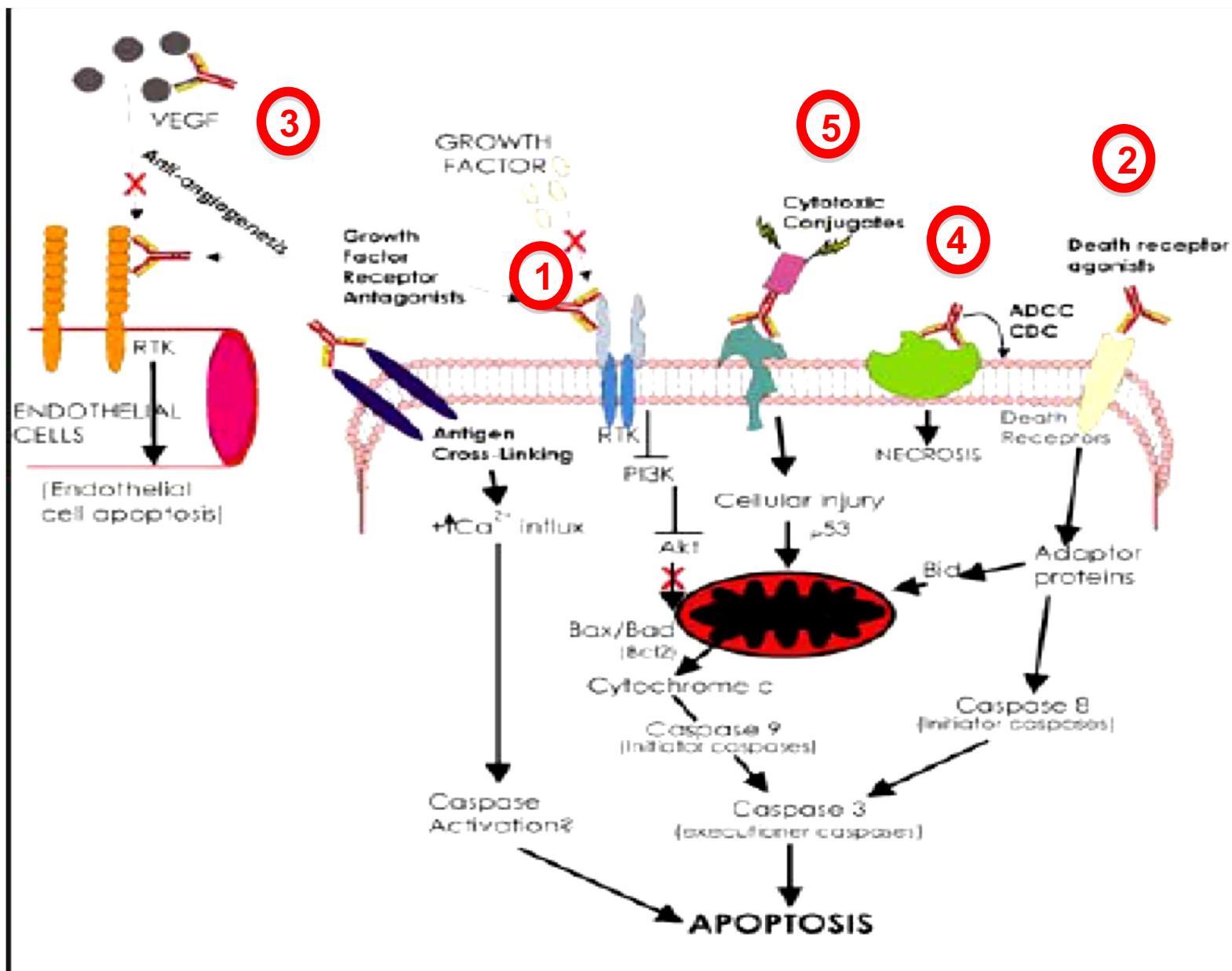
TCR + CD3 prende il nome di:
COMPLESSO DEL TCR



Meccanismi d'azione degli anticorpi monoclonali in ambito clinico

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 molecole con attività citotossica ad essi legate, a bersagli cellulari (ADC).
6. Bloccando checkpoint immunitari (es. PD-1)



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

Recently, Nature Reviews Drug Discovery released an article titled "**Top Product Forecasts for 2024**", predicting the top 10 pharmaceutical products in 2024, all of which are projected to exceed ten billion dollars in sales.

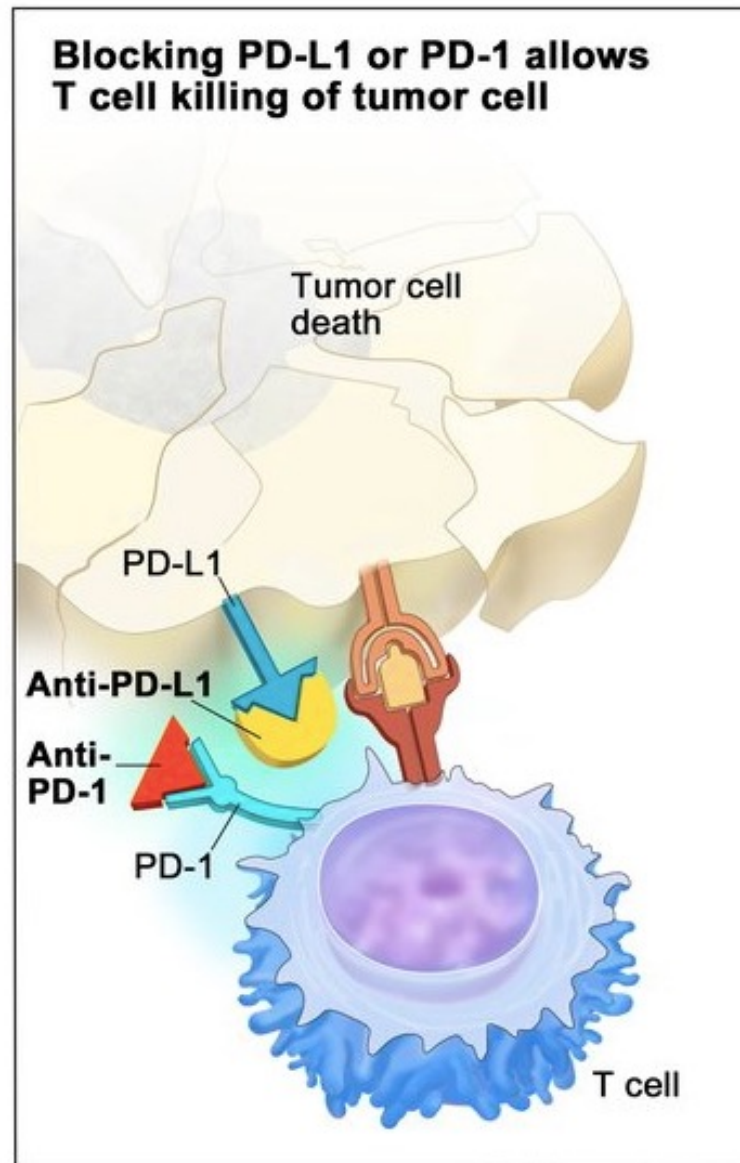
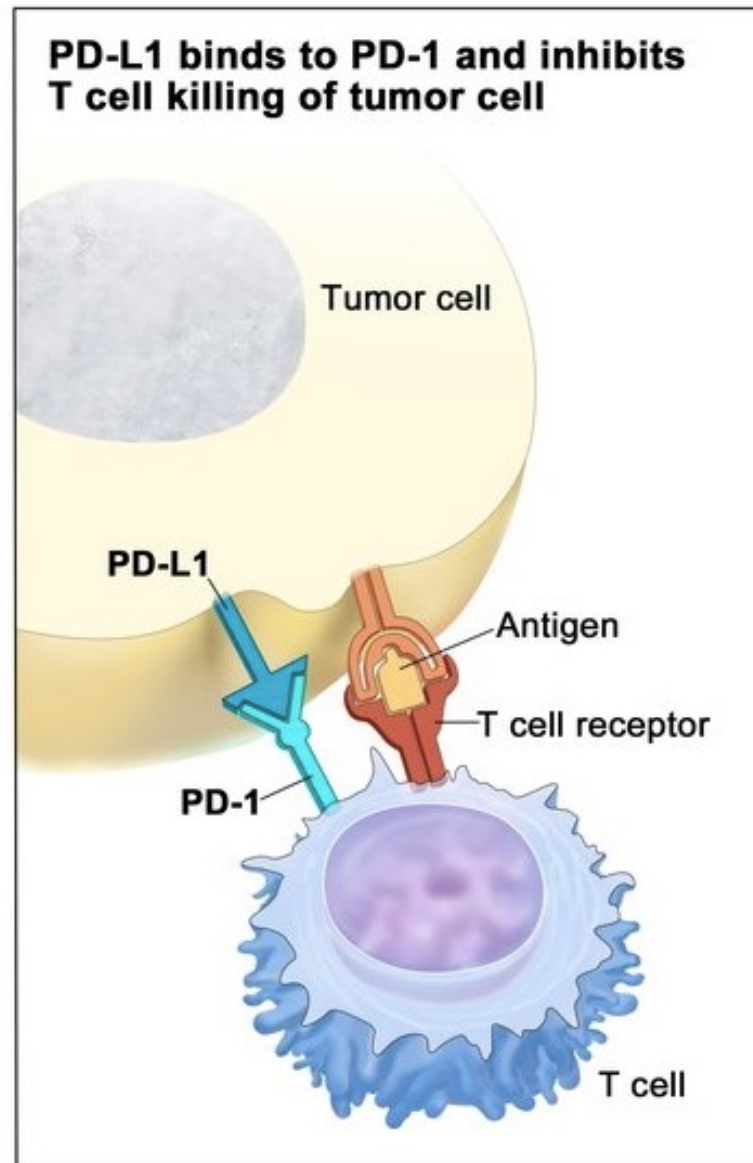
Table 1 | Top product forecasts for 2024

Rank	Product	Company	Pharmacological class	2024 worldwide sales forecast (US\$)
1	Keytruda	Merck & Co.	Anti-PD1 mAb	27.19 billion
2	Ozempic	Novo Nordisk	GLP1 receptor agonist	16.13 billion
3	Dupixent	Sanofi/Regeneron	Anti-IL-4/IL-13 mAb	13.45 billion
4	Eliquis	Bristol Myers Squibb/Pfizer	Factor Xa inhibitor	13.31 billion
5	Biktarvy	Gilead Sciences/Yuhan	HIV INSTI/NRTI/NtRTI	12.57 billion
6	Darzalex	Johnson & Johnson	Ant-CD38 mAb	11.98 billion
7	Opdivo	Bristol Myers Squibb/Ono	Anti-PD1 mAb	11.33 billion
8	Comirnaty	Pfizer/BioNTech	SARS-CoV-2 vaccine	10.79 billion
9	Gardasil	Merck & Co./CSL	HPV vaccine	10.03 billion
10	Skyrizi	AbbVie	Anti-IL-23 mAb	9.93 billion

Forecasts include sales booked by global marketing partner, where relevant. Estimates based on sellside equity analyst models, compiled by Evaluate Pharma to generate a consensus view. INSTI, integrase strand transfer inhibitor; GLP1, glucagon-like peptide 1; HPV, human papilloma virus; mAb, monoclonal antibody; NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitor; NtRTI, nucleotide reverse transcriptase inhibitor; PD1, programmed cell death protein 1; SARS-CoV-2; severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. Source: EvaluatePharma and company statements, December 2023.

Figure 1. Top Product Forecasts for 2024 [1]

Farmaci biologici: Pembrolizumab (Keytruda®) e Nivolumab (Opdivo®) anticorpi monoclonali anti-PD-1; **Avelumab** (Bavencio®) e Durvalumab (Imfinzi®) anticorpi monoclonali anti-PD-L1;



I coniugati anticorpo-farmaco (ADC)

Trade name	Drug	Maker	Target	Approval Date	2021 Sales (Million U.S. dollars)
Kadcyla	Trastuzumab emtansine	Genentech, Roche	HER2	Feb 22, 2013	2178
Adcetris	Brentuximab vedotin	Seattle Genetics, Millennium/Takeda	CD30	Aug 19, 2011	1306
Enhertu	Trastuzumab deruxtecan	AstraZeneca/Daiichi Sankyo	HER2	Dec 20, 2019	426
Trodelyv	Sacituzumab govitecan	Immunomedics	Trop-2	Apr 22, 2020	380
Padcev	Enfortumab vedotin	Astellas/Seattle Genetics	Nectin-4	Dec 18, 2019	340
Polivy	Polatuzumab vedotin-piiq	Genentech, Roche	CD79	Jun 10, 2019	271
Besponsa	Inotuzumab ozogamicin	Pfizer/Wyeth	CD22	Jun 28, 2017	192
Blenrep	Belantamab mafodotin-blmf	GlaxoSmithKline (GSK)	BCMA	Aug 5, 2020	122
Zynlonta	Loncastuximab tesirine-lpyl	ADC Therapeutics	CD19	Apr 3, 2021	34
Aidixi	Disitamab Vedotin	RemeGen	HER2	Jun 9, 2021	84 (CNY)
Tivdak	Tisotumab vedotin-tftv	Seagen Inc	TF	Sep 20, 2021	6
Mylotarg	Gemtuzumab ozogamicin	Pfizer/Wyeth	CD33	May 17, 2000	/
Lumoxiti	Moxetumomab pasudotox	Astrazeneca	CD22	Sep 13, 2018	/
Akalux	Cetuximab sarotalocan	Rakuten Medical	EGFR	Sep 25, 2020	/

Evolution of Therapeutic Monoclonal Antibodies

