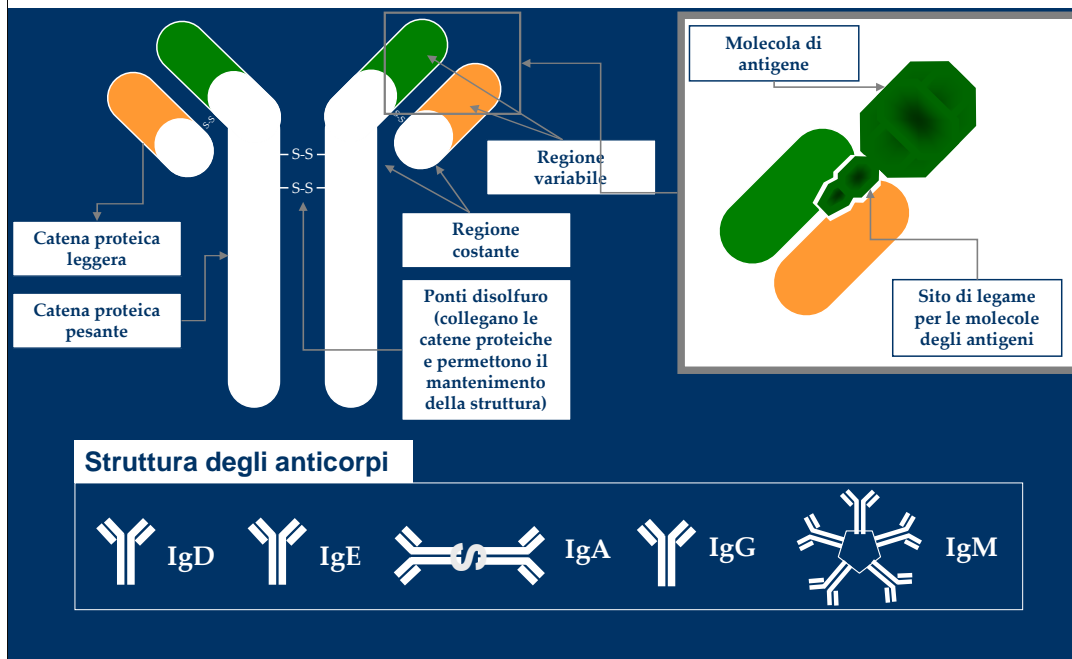


Anticorpi Monoclonali

Università degli Studi di Cagliari
Dipartimento di Neuroscienze “B. B. Brodie”
Sezione di Farmacologia Clinica

Anticorpi



Gli anticorpi, che si possono raggruppare in cinque classi distinte (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE), hanno una stessa struttura di base: sono costituiti da due coppie di molecole proteiche, disposte a Y e legate fra loro mediante ponti disolfuro, ossia mediante l'interazione di atomi di zolfo. Due catene proteiche hanno un elevato peso molecolare e sono perciò dette "pesanti"; le altre due hanno un peso inferiore e sono dette "leggere". Sia nelle catene leggere, sia in quelle pesanti vi sono regioni definite costanti, che hanno struttura simile negli anticorpi di una stessa classe; le regioni variabili sono invece estremamente differenziate (cioè formate da amminoacidi diversi) e permettono agli anticorpi il riconoscimento di una enorme quantità di molecole estranee (antigeni). Il riconoscimento tra un anticorpo e un antigene avviene secondo un principio di complementarietà dei rispettivi siti di legame.

Anticorpi Monoclonali

➤ Sono anticorpi a specificità nota derivanti da singoli cloni produttori

ossia

➤ Molecole anticorpali identiche tra loro e specifiche per un certo determinante antigenico

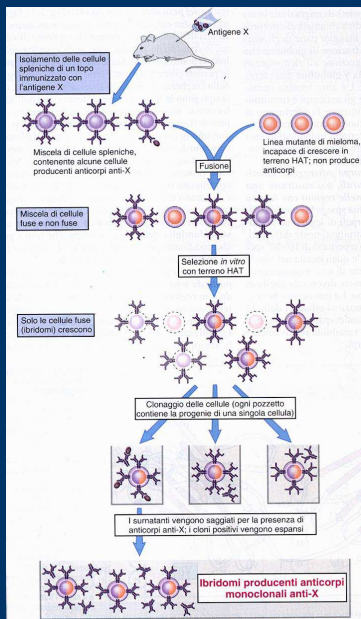
➤ Ogni specifico anticorpo, che riconosce uno specifico epitopo, è prodotto da uno specifico linfocita B. Tuttavia i linfociti B coltivati in vitro, muoiono dopo brevissimo tempo.

Epitopo = determinante antigenico

Anticorpi Monoclonali

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.

Anticorpi Monoclonali: produzione



- Vengono prodotti da ibridi cellulari (detti ibridomi), costituiti da linfociti B murini specifici per un determinato antigene (Ag), fusi con cellule mielomatose non anticorpo secernenti.
- Tali ibridomi risultano avere sia le caratteristiche di:
 - ✓ **immortalità** → conferita dalle cellule mielomatose
 - ✓ **secernere anticorpi** → propria dei linfociti B

Immagine tratta da: Abbas Immunologia cellulare e molecolare IV ediz. Italiana Piccin 2002

Per produrre un anticorpo monoclonale specifico per un certo antigene è necessario immunizzare un topo con tale antigene, i linfociti B vengono poi isolati dalla milza o dai linfonodi dell'animale. Si procede poi alla fusione dei linfociti B con la linea immortalizzata adatta. Le linee di mieloma sono i partners di fusione migliori per i linfociti B, dato che queste cellule tendono a fondere e dare origine ad ibridi stabili con più efficienza rispetto ad altre cellule immortalizzate. Gli ibridi generati vengono selezionati in terreni di coltura selettivi contenenti ipoxantina, aminopterina e timidina (HAT), in queste condizioni le cellule di mieloma non fuse muoiono, mentre i linfociti B che non si sono fusi non possono sopravvivere per più di due settimane, cresceranno e sopravvivranno così solo gli ibridi. Le cellule fuse vengono poi seminate in diluizione limite, ossia in maniera tale che ogni pozzetto di coltura contenga solo una cellula di ibridoma; i sovranatanti di ciascun pozzetto vengono quindi saggiati per la presenza di anticorpi in grado di reagire con l'antigene impiegato per l'immunizzazione. Una volta identificati i pozzetti positivi (ossia i pozzetti contenenti l'anticorpo della specificità voluta), le cellule vengono clonate e i cloni produttori l'anticorpo vengono identificati con uno screening simile al primo. Per ottenere grandi quantità di anticorpi è possibile far crescere i cloni di ibridoma che producono anticorpi della specificità voluta in colture su larga scala.

Abbas Immunologia cellulare e molecolare IV ediz. Italiana Piccin 2002

Anticorpi Monoclonali: applicazioni

Nella pratica clinica, gli mAb vengono utilizzati in numerose **applicazioni diagnostiche e terapeutiche** (sia in quanto tali, sia come agenti veicolatori di farmaci su bersagli specifici)

In ambito terapeutico essi vengono impiegati fundamentalmente come agenti:

- Immunosoppressori
- Antineoplastici
- Inibitori dell'angiogenesi
- Altri (es antiaggreganti)

Esempi di immunosoppressori:

Muromonab-CD3, infliximab, omalizumab, daclizumab

Esempi di antineoplastici:

Rituximab, zevalin, tositumomab, trastuzumab, cetuximab, alemtuzumab

Esempi di inibitori dell'angiogenesi

Bevacizumab

Altri

Abciximab, abciximab

Anticorpi Monoclonali: applicazioni

Anticorpi monoclonali non coniugati approvati in oncologia

	Specie di origine	Isotipo	Tossina	Target	Indicazione
Trastuzumab	umanizzato	IgG ₁	-	HER/neu	Tumore mammella
Rituximab	Murino/Umano chimerico	IgG ₁	-	CD20	Linfoma
Cetuximab	Murino/Umano chimerico	IgG ₁	-	EGF-R	Tumore colon-retto
Bevacizumab	Murino/Umano chimerico	IgG ₁	-	VEGF	Tumori colon-retto, mammella e polmone
Alemtuzumab	umanizzato	IgG ₁	-	CD52	Leucemia linfocitica cronica

Tabella modificata da:

Louis M Weiner, Madhav V Dhodapkar, Soldano Ferrone **Monoclonal antibodies for cancer immunotherapy** *Lancet* 2009; 373: 1033–40

Anticorpi Monoclonali: indicazioni terapeutiche

Fra le condizioni in cui si è dimostrata l'efficacia dei mAb rientrano:

- artrite reumatoide
- morbo di Crohn
- alcune neoplasie (in particolare del sistema emolinfopoietico)
- prevenzione della necrosi ischemica del miocardio secondaria a trombosi coronarica

Peraltro, l'indicazione all'uso della terapia con mAb resta tuttavia selettiva, essendo in genere limitata a **pazienti refrattari ad altri tipi di trattamento.**

Anticorpi Monoclonali: meccanismo d'azione

➤ L'effetto biologico e terapeutico esercitato dai mAb si basa sull'instaurarsi di un **legame specifico tra l'anticorpo e l'antigene bersaglio**.

➤ In base al meccanismo d'azione possono essere classificati in:

Anticorpi monoclonali nudi

Anticorpi monoclonali coniugati

Tossine

Sostanze Radioattive

Farmaci

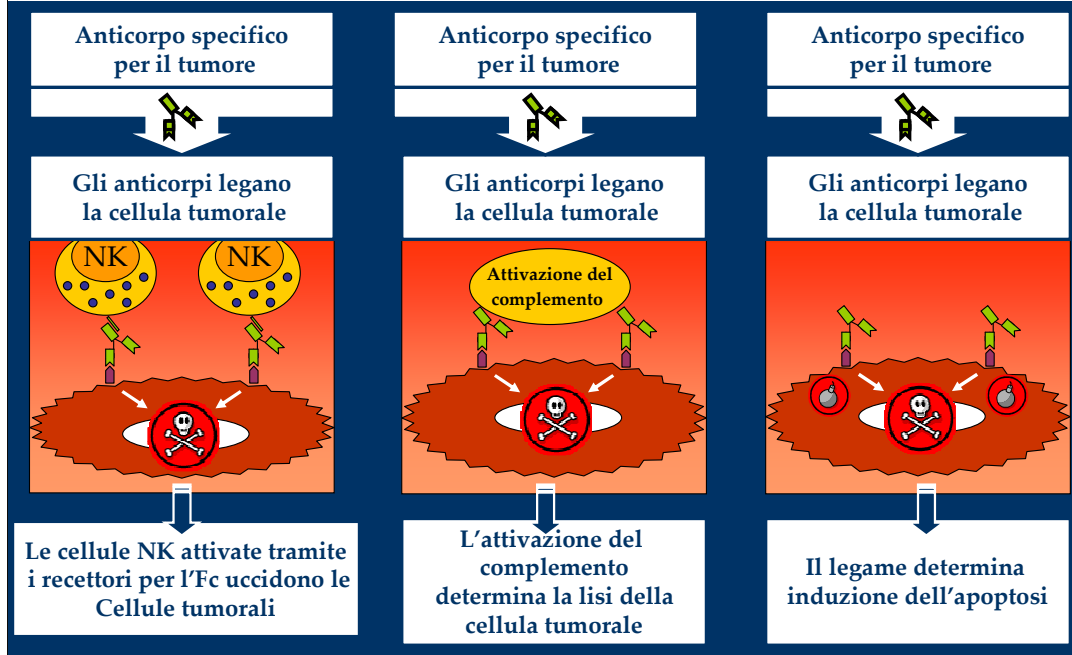
Enzimi attivatori di un profarmaco

Anticorpi Monoclonali: meccanismo d'azione

Lisi della cellula target mediante:

- **Citotossicità dipendente dal complemento** (CDC) lisi del target tramite fissazione del complemento (quando si utilizzano determinate immunoglobuline, quali IgG1 e IgG3)
- **Citotossicità dipendente dall'anticorpo** (ADCC) quando gli antigeni bersaglio sono localizzati sulla parete cellulare
- **Effetto opsonizzante del frammento costante** (Fc) monoclonale quando gli antigeni bersaglio vengono fagocitati o sequestrati (rispettivamente, dai fagociti circolanti e dalle cellule del sistema reticolo-endoteliale)
- **Induzione diretta dell'apoptosi** della cellula esprimente l'antigene

Anticorpi Monoclonali: meccanismo d'azione



Anticorpi Monoclonali: meccanismo d'azione

L' **effetto immunosoppressore** può essere ottenuto bloccando:

- Molecole responsabili **dell'iniziazione** della risposta immune cellulo-mediata (molecole HLA di classe II, recettore T cellulare)
- **Molecole accessorie** (quali CD4, CD8, CD28) che inviano alla cellula un segnale costimolatorio
- **Molecole di adesione** (CD11/ CD18, CD54, VCAM-1, le selectine) deputate tanto a mediare i contatti intercellulari quanto la migrazione cellulare nel sito di flogosi
- **Fattori solubili**, quali le citokine (ad esempio il TNF-alfa) coinvolte nell' amplificazione della risposta immune

Anticorpi Monoclonali: meccanismo d'azione

Azione antitumorale

Si può ricorrere a mAb che **lisano direttamente le cellule neoplastiche** oppure a **mAb coniugati** a:

- Tossine
 - Sostanze radioattive
 - Farmaci (oppure enzimi attivatori di un profarmaco)
- *Si possono accoppiare chemioterapici antitumorali (adriamicina, metotrexato e alcaloidi della vinca..) ad anticorpi monoclonali specifici per le proteine situate alla superficie delle cellule tumorali*

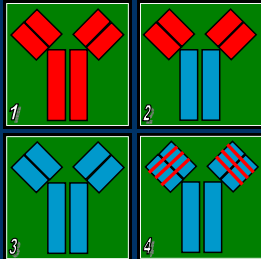
Anticorpi Monoclonali: limiti

Limiti degli anticorpi monoclonali murini

- inducono una risposta immunitaria
- mostrano una emivita relativamente breve quando somministrati all'uomo
- si ha uno scarso riconoscimento del dominio Fc degli anticorpi murini da parte dei meccanismi effettori umani
- **pertanto vengono di solito resi chimerici o umanizzati**

Anticorpi Monoclonali: limiti

Tipi di mAb



- | | |
|-------------------|----------|
| 1: mAb murino | ■ Umano |
| 2: mAb chimerico | ■ Murino |
| 3: mAb umano | |
| 4: mAb umanizzato | |

Gli anticorpi chimerici:

- sono meno immunogenici
- hanno una prolungata emivita sierica
- permettono l'attivazione di varie funzioni mediate dalla regione Fc

Grado di risposta immunitaria osservata dopo singola dose:

- 80%, per gli anticorpi murini,
- 5% per gli anticorpi chimerici.

Resta comunque la possibilità che **ripetute somministrazioni** di anticorpi chimerici portino a risposta immunitaria nel ricevente.

Anticorpi chimerici e umanizzati

La tecnologia del DNA ricombinante ha fornito un metodo per ridurre l'immunogenicità degli anticorpi monoclonali murini. Sono stati clonati i geni di tutti i sottotipi di immunoglobuline umane per produrre anticorpi ibridi ad immunogenicità ridotta.

La prima alternativa è stata la produzione di anticorpi chimerici che conservano la specificità di legame ma assomigliano maggiormente a un anticorpo umano naturale.

Gli anticorpi chimerici:

sono meno immunogenici, hanno una prolungata emivita sierica e permettono l'attivazione di varie funzioni mediate dalla regione Fc.

Il grado di risposta immunitaria osservata dopo la somministrazione di una singola dose è calato dall'80%, nel caso degli anticorpi murini, al 5% per gli anticorpi chimerici. Resta comunque la possibilità che ripetute somministrazioni di anticorpi chimerici portino a risposta immunitaria nel ricevente.

L'"ibridazione" degli anticorpi monoclonali di topo e di ratto è stata ulteriormente sviluppata sostituendo negli anticorpi umani solo le CDR (regioni ipervariabili) degli anticorpi monoclonali di roditore.

Dato che possiedono affinità di legame per l'antigene simile a quella degli anticorpi monoclonali di roditore originali, questi anticorpi "umanizzati" potrebbero dimostrarsi clinicamente utili.

Anticorpi Monoclonali: nomenclatura

RI TU XI MAB

Prefisso

**Suffisso:
MAB**

Target dell'anticorpo

vir	⇒	Virale
bac	⇒	Batterico
lim	⇒	Immune
cir	⇒	Cardiovascolare
col	⇒	Colon
mel	⇒	Melanoma
mar	⇒	Mammario
gov	⇒	Ovario
pro	⇒	Prostata
tu(m)	⇒	Tumori

Origine del prodotto

U	⇒	Umano
O	⇒	Topo
A	⇒	Ratto
XI	⇒	Chimerico
ZU	⇒	Umanizzato

Anticorpi Monoclonali: reazioni avverse da farmaci (ADR)

ADR di tipo A (augmented) : determinate dal meccanismo d'azione del farmaco e prevedibili

ADR di tipo B (bizarre) : non correlate al meccanismo d'azione del farmaco e non prevedibili

La reazione avversa da farmaci (ADR) è definita dall'Organizzazione Mondiale della Sanità come la risposta ad un farmaco nociva, non intenzionale e che avviene alle dosi normalmente usate per la profilassi, la diagnosi o la terapia della malattia, o a seguito di modificazioni della fisiologia (es. gravidanza e allattamento).

Le ADR vengono classificate principalmente in reazioni avverse di tipo A (dovute al farmaco) e reazioni avverse di tipo B (reazioni del paziente).

Le ADR di tipo A consistono in un' esagerata azione di un farmaco assunto a dosi terapeutiche, sono ampiamente prevedibili sulla base del meccanismo d'azione del farmaco e dose-dipendenti. Sebbene la loro incidenza e morbilità sia spesso elevata, la mortalità è generalmente bassa.

Le ADR di tipo B non sono ascrivibili ad un eccesso di attività farmacologica nota, ma sono in genere associabili a condizioni individuali predisponenti, spesso ignote prima che l'evento si verifichi. Per questi motivi esse tendono ad essere imprevedibili, non sono sempre dose-dipendenti e la loro incidenza è in genere relativamente bassa (< 1/1000). Rientrano in questa categoria le reazioni allergiche e quelle idiosincrasiche.

Anticorpi Monoclonali: reazioni avverse da farmaci (ADR)

Gli agenti biologici differiscono dalla maggior parte degli altri farmaci perché sono *proteine simili alle proteine umane*

Non sono metabolizzati come gli altri farmaci ma vengono processati come le normali proteine e somministrati per via parenterale per evitare la degradazione da parte del tratto GI

Gli agenti biologici sono utilizzati come farmaci, ma possiedono diverse caratteristiche che li distinguono dai comuni farmaci, è quindi necessario nella valutazione delle reazioni avverse da agenti biologici ricorrere ad un approccio differente perché questi agenti, compresi gli anticorpi monoclonali, differiscono dalla maggior parte degli altri farmaci perché non sono piccoli composti chimici (xenobiotici) ma proteine prodotte in modo tale da essere il più possibile simili alle proteine umane, non sono metabolizzati come i comuni farmaci ma processati come le comuni proteine e pertanto per evitare la digestione da parte del tratto gastrointestinale è necessaria la somministrazione per via parenterale. Le differenze fra gli agenti biologici e gli xenobiotici riguardano il meccanismo d'azione, la chimica, il metabolismo e l'immunogenicità. Sulla base di questi presupposti è stata proposta una nuova classificazione per gli effetti avversi da agenti biologici. Questa sottoclassificazione potrebbe essere utile per meglio identificare e trattare i pazienti che vanno incontro a reazioni avverse da farmaci biologici.

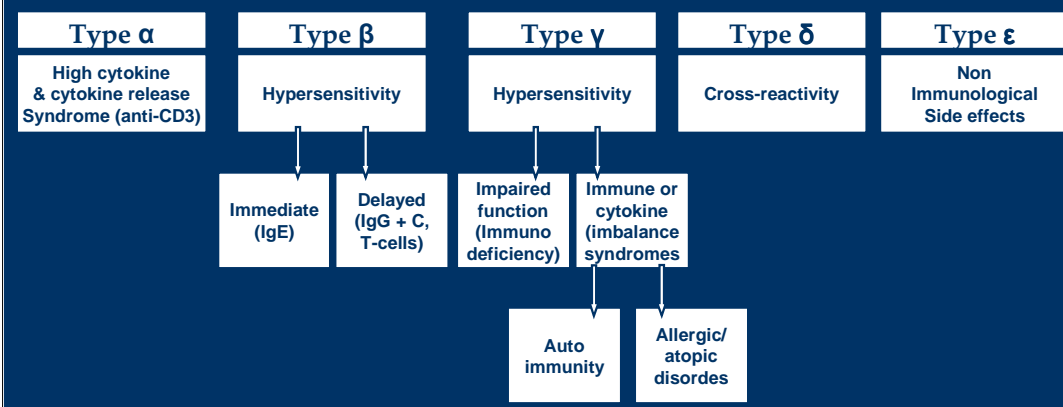
Anticorpi Monoclonali: reazioni avverse da farmaci (ADR)

Differenze relative alle reazioni avverse tra farmaci biologici e classici (W. J. Pichler - Adverse side-effects to biological agents. Allergy 2006; 61: 912-920)

Agenti biologici	Farmaci classici
Strutturalmente simili alle proteine autologhe	Sintetizzati chimicamente
Vengono processati ma non metabolizzati	Metabolizzati, gli intermedi reattivi sono potenzialmente immunogeni
Richiesta la somministrazione parenterale	Somministrazione orale o parenterale
Gli effetti immunomediati sono legati alla loro attività, ma le reazioni di ipersensibilità sono rare e principalmente dovute alle immunoglobuline (IgE e IgG)	Gli effetti immunomediati sono inattesi, differiscono dalla normale attività del farmaco e sono spesso mediati da cellule T

Anticorpi Monoclonali: reazioni avverse da farmaci (ADR)

Classificazione alternativa



Modificato da: W. J. Pichler - Adverse side-effects to biological agents. Allergy 2006; 61: 912-920

Recentemente le reazioni avverse da agenti biologici sono state suddivise in effetti avversi correlati al target ed effetti avversi correlati al farmaco. In realtà, gli effetti avversi correlati al target sono comuni per gli agenti biologici, ad esempio gli agenti biologici possono modificare la composizione e l'integrità funzionale della normale risposta immunitaria e predisporre il paziente ad alcuni effetti avversi, mentre l'agente in sé è innocuo. Per meglio comprendere la grande varietà degli effetti avversi da agenti biologici, è importante considerare non solo l'attività di questi farmaci in una data malattia, ma anche l'influenza che essi esercitano sul normale equilibrio del sistema immunitario.

La particolarità di questi agenti biologici non consente di utilizzare una classificazione dei loro effetti collaterali sulla base dei sintomi clinici. È più appropriata una classificazione che si basa sul meccanismo d'azione e sulla struttura di queste molecole. Per distinguere questa classificazione da quella usata per i comuni farmaci, si è deciso di utilizzare l'alfabeto greco: reazioni avverse di tipo α , β , γ , δ ed ϵ .

In questa classificazione le reazioni di tipo α degli agenti biologici e A dei comuni farmaci sono simili, entrambe sono dose-dipendenti e correlate con la funzione del farmaco o dell'agente biologico mentre le reazioni di tipo B per i farmaci sono sovrapponibili alle reazioni di tipo β che comprendono le reazioni di ipersensibilità.

Anticorpi Monoclonali: reazioni avverse da farmaci (ADR)

Type α high cytokine and cytokine release syndrome

- La maggior parte delle citochine svolgono una funzione locale, alcune esercitano anche una funzione sistemica
- Le citochine somministrate a scopi terapeutici agiscono con modalità opposta e possono causare, per le elevate concentrazioni sistemiche, la comparsa di reazioni avverse intollerabili (febbre, mialgia, cefalea, etc.)
- Gli anticorpi anti-CD3 possono causare la sindrome da rilascio di citochine

Reazioni di Tipo α

Reazioni avverse di tipo α : gli effetti avversi possono essere connessi alla somministrazione di alte dosi di citochine o al rilascio in circolo di una elevata concentrazione di citochine

La maggior parte delle citochine sono prodotte localmente ed esercitano prevalentemente un'attività locale: la loro azione è paracrina (diretta nei confronti delle cellule adiacenti), o autocrina (diretta contro la stessa cellula che le ha prodotte). Alcune citochine come il TNF- α o l'IL-5 possiedono anche un'attività sistemica.

Se le citochine vengono somministrate per scopi terapeutici, la situazione si inverte, si somministrano elevate concentrazioni sistemiche per raggiungere un'adeguata concentrazione locale.

Le concentrazioni sistemiche elevate possono, in alcuni casi, causare effetti collaterali gravi e non tollerabili che limitano l'uso delle citochine stesse (febbre, mialgia, cefalea).

In alternativa, altri anticorpi monoclonali come quello diretto contro il CD3 possono provocare l'attivazione dei linfociti T, il rilascio in circolo di diverse citochine e la conseguente comparsa della sindrome da rilascio di citochine caratterizzata da sintomi generali quali vampate, artralgia, edema polmonare, encefalopatia, meningite asettica, ipertensione, sintomi gastrointestinali come vomito e diarrea.

Anticorpi Monoclonali: reazioni avverse da farmaci (ADR)

Type β hypersensitivity reactions to biological agents

- Grado di immunizzazione: dirette contro il farmaco biologico e dipendenti dal grado di immunizzazione
- Cofattori: adiuvanti che stimolano l'immunogenicità
- Tipo di reazione allergica: reazioni IgE-mediate e non IGE-mediate

Reazioni di Tipo β

Reazioni avverse di tipo β : possono essere considerate reazioni di ipersensibilità, mediate dalle immunoglobuline E, dalle immunoglobuline G e dalle cellule T.

I fattori implicati nell'immunogenicità da agenti biologici e il tipo di sintomi clinici causati da vere reazioni di ipersensibilità sono diversi e possono dipendere da :

Grado di immunizzazione

Le reazioni allergiche da agenti biologici sono quelle dirette contro lo stesso farmaco biologico. La frequenza di queste reazioni dipende dal grado di umanizzazione della proteina somministrata che è spesso rappresentata da un anticorpo. La risposta allergica può essere diretta contro la parte costante o contro la parte variabile dell'anticorpo.

Cofattori

Un altro importante aspetto dell'immunogenicità da agenti biologici è determinato dal loro contenuto di adiuvanti. Inoltre, la modalità di somministrazione del farmaco (sottocute vs endovena), l'isotipo IgG dell'agente biologico ed in particolare il carico del trattamento concomitante immunosoppressivo, possono esercitare un'influenza.

Tipo di reazione allergica

Le reazioni allergiche IgE-mediate da farmaci biologici possono causare la comparsa di ematomi e reazioni locali nel sito di iniezione, ma anche orticaria e reazioni anafilattiche. Queste reazioni compaiono rapidamente, solitamente entro 20 minuti dall'iniezione.

La formazione di anticorpi diretti contro gli agenti biologici può portare all'attivazione della cascata del complemento con conseguente attivazione dei neutrofili, malattia da immunocomplessi come la malattia da siero, vasculiti e nefriti.

Anticorpi Monoclonali: reazioni avverse da farmaci (ADR)

Type γ **immune/cytokine imbalance syndromes**

- Immunodeficienza
- Squilibrio del funzionamento del SI o slatentizzazione di uno squilibrio preesistente
- Disturbi autoimmunitari e autoinfiammatori
- Disturbi atopici/allergici

Type γ

Le reazioni avverse di tipo γ possono essere considerate sindromi da squilibrio immunitario (citochine). Un elevato gruppo di reazioni avverse hanno caratteristiche immunologiche, ma non possono essere spiegate da elevate concentrazioni di citochine o dalle caratteristiche reazioni di ipersensibilità. Queste reazioni possono essere ulteriormente suddivise in: funzionamento compromesso del sistema immunitario, slatentizzazione o sviluppo di uno squilibrio immunitario che provoca reazioni autoimmunitarie, autoinfiammazione o reazioni allergiche.

Immunodeficienza (compromissione del funzionamento del sistema immunitario): diversi agenti biologici sono utilizzati nelle patologie infiammatorie o nei pazienti sottoposti a trapianto, e uno degli scopi del trattamento è quello di ridurre l'infiammazione e la risposta immunitaria diretta contro l'organo trapiantato. Uno degli effetti collaterali meglio conosciuti e per un certo grado atteso è la compromissione del funzionamento del sistema immunitario che si traduce nella comparsa dell'immunodeficienza. In realtà, queste reazioni potrebbero essere classificate come reazioni prevedibili di tipo α .

Squilibrio del funzionamento del Sistema Immunitario o slatentizzazione di uno squilibrio preesistente: la rottura dell'equilibrio può essere causata dall'eliminazione o dalla somministrazione di alcune citochine, che esercitano una funzione immunomodulatoria.

Disturbi autoimmunitari e autoinfiammatori: la neutralizzazione del Tumor necrosis factor α (TNF- α) provoca fenomeni autoimmunitari e raramente anche malattie autoimmunitarie.

Disturbi atopici/allergici: la risposta immunitaria nei confronti di antigeni esogeni innocui è solitamente soppressa, ma in alcune circostanze questi meccanismi di tolleranza falliscono e si possono sviluppare patologie atopiche/allergiche.

Anticorpi Monoclonali: reazioni avverse da farmaci (ADR)

Type δ cross-reactivity

Caratterizzata da fenomeni di cross-reattività dovuta all'espressione degli stessi antigeni in cellule differenti o alla presenza di anticorpi che reagiscono contro strutture simili

Type ϵ nonimmunological side-effects

Type δ

Nelle reazioni avverse di tipo δ gli anticorpi prodotti contro un antigene espresso dalle cellule tumorali possono anche cross-reagire con cellule normali che esprimono lo stesso antigene seppure in misura inferiore

Le reazioni di cross-reattività possono essere causate dall'espressione dello stesso antigene in tessuti differenti o dal fatto che gli anticorpi reagiscono con strutture simili. Gli antigeni tumorali sono spesso proteine normali che sono sovra espresse nelle cellule tumorali. Pertanto gli anticorpi diretti contro questi antigeni potrebbero anche reagire con queste strutture localizzate nelle cellule normali.

Type ϵ

Reazioni avverse di tipo ϵ : alcuni agenti biologici possono causare sintomi che non sono direttamente correlati con il Sistema Immunitario, alcune volte rivelano funzioni degli agenti biologici non note.

Numerose molecole, originariamente identificate nel sistema immunitario e nella risposta infiammatoria possono essere coinvolte anche in altre funzioni fisiologiche e l'uso dei farmaci biologici

nell'uomo potrebbe rivelare queste nuove funzioni. Le manifestazioni legate agli effetti non immunologici dei farmaci biologici possono essere in realtà abbastanza frequenti.

Esempi di queste reazioni possono essere gli effetti avversi neuropsichiatrici, come lo stato confusionale acuto e la depressione, legati al trattamento con IFN- α .